

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Control presináptico por receptores acoplados a proteínas G, GPCRs,
en un ratón modelo del síndrome del X frágil.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Nuria García Font

Directores

Jesús Sánchez-Prieto Borja

María Jesús Oset Gasque

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**Control presináptico por receptores acoplados a
proteínas G, GPCRs, en un ratón modelo del
síndrome del X frágil.**

Tesis doctoral

Nuria García Font

Directores:

**José Sánchez-Prieto Borja
María Jesús Oset Gasque**



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Nuria García Font,
estudiante en el Programa de Doctorado Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina,
de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Control presináptico por receptores acoplados a proteínas G, GPCRs, en un ratón modelo del síndrome del X frágil.

y dirigida por: José Sánchez-Prieto Borja y María Jesús Oset Gasque

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 28 de mayo de 2019

Fdo.: Nuria García Font

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Control presináptico por receptores acoplados a proteínas G, GPCRs, en un ratón modelo del síndrome del x frágil.

Memoria presentada por **Nuria García Font** para acceder al grado de **Doctora**
en **Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina.**

Directores:

José Sánchez-Prieto Borja
María Jesús Oset Gasque

Tutor:

María Jesús Oset Gasque

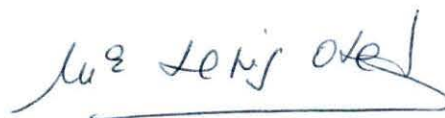
Madrid, 2019

VºBº Directores

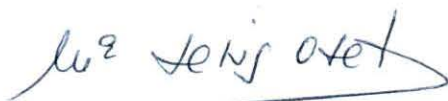


José Sánchez-Prieto Borja

VºBº Tutor



María Jesús Oset Gasque



María Jesús Oset Gasque

AGRADECIMIENTOS:

«El autismo, no hay duda, es una enfermedad que siempre ha existido, afectando a algún que otro individuo en todas las épocas y culturas. En la mente de las gentes siempre ha provocado una actitud de asombro, temor o perplejidad [...] (Leo Kanner y Hans Asperger) ponen énfasis en la “soledad”, la soledad mental, como rasgo cardinal del autismo.»

Oliver Sacks. *Un antropólogo en Marte*.

La realización de un Doctorado, que tiene su colofón en la escritura de la Tesis Doctoral, es un proceso arduo, lleno de alegrías, pero, también, de sinsabores. Y es un camino que no puede realizarse solo. Como cualquier aventura que se precie, requiere consejos, aprendizaje, experiencia y tesón. Por ello, en primer lugar, quiero agradecérselo a mis directores, Pepe y María Jesús, por haberme guiado durante estos años sin dejar que me saliera de la senda. Sin ellos, mi sueño de convertirme en una investigadora no hubiese sido posible.

Gracias a Ricardo porque, aunque no figure como tal, ha sido un director más de esta tesis y ha sabido apoyarme e infundirme ánimos en los momentos más duros. Para mí, es un ejemplo de compañerismo y perseverancia. También a Jose porque fue capaz de mostrarme los entresijos del laboratorio con infinita paciencia, especialmente en lo que a sinaptosomas se refiere, y porque ha sido una fuente de conocimiento y de buen humor.

Gracias a Magdalena por tener siempre una sonrisa y un buen consejo nacido de la experiencia. También a Alberto, que comienza a dar sus primeros pasos en el doctorado, y al «otro» Alberto, que ya ha recorrido este camino de manera impecable. A Maricarmen por ser como una madre en el laboratorio. Y, cómo no, gracias a las personas que han estado en nuestro grupo y a las que hubiese querido tener a mi lado durante estos cinco años: Bea, Andrea, David y Mayka. No me olvido tampoco de dos grandes mujeres que han sido y son un soporte imprescindible para nuestro departamento, Alba y Carmen.

Muchas gracias a mis compañeros de enfrente. A María José porque es una mezcla de carácter y buen humor. A Lucía porque cada día lucha por lo que quiere. A Juan Carlos y a María porque han sido una fuente de ayuda y buenos ratos. Y dentro de esos compañeros incluyo a los directores que crean puentes para salvar el abismo entre jefe y doctorando. A Felipe porque siempre consigue hacerme reír. A Raquel por arroparme con su amabilidad y su implicación. A Rosa por su energía positiva. A Miguel por su afabilidad. A María Teresa por interesarse siempre por mi trabajo.

No me olvido de las personas de Farmacia. Le doy las gracias a Carlos por su apoyo y por darme alas para explotar mi potencial como docente. También a Bea porque no se amedrantaba ante ninguna dificultad. A Neibla, Celia y Analisa por haber estado siempre dispuestas a echarme una mano cuando las técnicas del laboratorio se resistían. A Pilar

por su paciencia y su disposición a ayudarme con mis dudas. A Pili porque es una fuente de conocimiento y experiencia. A César y a Fernando por hacerme disfrutar tanto de las prácticas de laboratorio. Y, aunque técnicamente no forma parte de la facultad de Farmacia, quiero darle las gracias a José Luis por su energía inagotable y porque ha sabido inculcarme la pasión por la búsqueda de nuevos tratamientos. Nunca olvidaré que somos el Tacrine's team. También a Marisa por tantas horas buscando la sinapsis perfecta.

Gracias al grupo de Javier Fernández Ruiz por desvelarme los misterios del rotarod y del balance beams, especialmente a Claudia y a Carmen. También le doy las gracias al grupo de Ismael Galve y en especial a Daniel por su ayuda con las pruebas de comportamiento.

Quiero hacer una especial mención a lo que ha sido, sin duda, la piedra angular de esta travesía y son nuestros pequeños compañeros peludos de los que, creo y confío, nunca dejaré de aprender. Aquí deseo mencionar a mi pequeña Gretel, que me ha visto formarme casi hasta el final, y a Shrodinger, que, técnicamente, solo ha visto el final. Tampoco me olvido de Nahí y Pistón, capaces de aliviar cualquier tristeza con un lametazo o una carantoña.

Un apartado especial merece mi familia porque, si en el laboratorio son mis compañeros los que me ayudan a construir mi futuro científico, fuera del laboratorio es mi familia la que me mueve a convertirme en la mejor persona que puedo llegar a ser. Gracias a mis padres porque son todo: cariño, apoyo, motivación y ejemplo. Sin ellos no sé qué hubiese hecho cuando sentía que no iba a poder conseguirlo. Gracias a mi hermana porque, a pesar de todo, nuestra unión es inquebrantable. Gracias a mis abuelos porque siempre me han cuidado y querido como unos segundos padres. Y gracias a Carlos, Ángela y Maite por ser la parte de mi familia que he elegido.

Gracias a todos mis amigos por su cariño y por tan buenos ratos juntos que, espero, no acaben nunca: Alberto, Jorge, Cristina «Sanmi», Irene, Álvaro, Marta, Héctor y Cris. Y también a mis chicas del máster, Moni y Melu, por compartir conmigo la pasión por la amistad y la Neurociencia. No me olvido tampoco de Tano y de María, gracias por formar parte de mi familia.

Y, por último, destacar a mi media langosta, a mi asturiano de sonrisa eterna. Gracias por hacerme ver todo lo que valgo y por apoyarme incondicionalmente en lo bueno, lo malo y lo mejor.

ÍNDICE:

RESUMEN	1
SUMMARY	5
I. INTRODUCCIÓN.....	11
1. Las sinapsis glutamatérgicas.	11
1.1. El glutamato y su liberación.	11
1.1.1. El ciclo vesicular.	12
1.1.2. La zona activa.	15
-RIM	17
-Munc13	19
-Canales de calcio dependientes de voltaje.....	21
1.1.3. Preparación de las vesículas para la fusión.	23
1.1.4. Mecanismo de la exocitosis.....	26
1.2. Receptores de la sinapsis glutamatérgicas. Receptores ionotrópicos de glutamato.	27
1.3. Receptores de la sinapsis glutamatérgicas. Receptores acoplados a proteínas G.	28
1.3.1. Receptores metabotrópicos de glutamato.....	30
1.3.1.1. Receptores mGlu7	32
-Modulación de la liberación de glutamato y de la transmisión sináptica por receptores mGlu7.....	36
1.3.2. Heteroreceptores. Sistema endocannabinoide. Receptores CB1..	39
-Receptores CB1	41
1.3.3. Heteroreceptores. Sistema noradrenérgico. Receptores β adrenérgicos	46
-Liberación de glutamato. Señalización presináptica	

de los β ARs.	48
- Proteínas Epac.	51
- Modulación de la maquinaria exocitótica por los β ARs.	54
- Plasticidad sináptica dependiente de AMPc.	55
- Fosfodiesterasas.	56
2. El síndrome del X frágil.	58
2.1. Gen <i>Fmr1</i>	59
2.2. Proteína FMRP.	61
2.3. Alteraciones de la función sináptica y de la modulación por GPCRs. ...	66
2.4. Estrategias terapéuticas	69
2.5. Ratón modelo del síndrome del X frágil	70
II. OBJETIVOS ...	77
III. MATERIAL Y MÉTODOS.	81
1. Materiales. ...	81
1.1. Material biológico.	81
1.2. Reactivos, medios y fármacos.	81
1.3. Equipos.	86
2. Métodos.	87
2.1. Preparación de sinaptosomas.	87
2.2. Liberación de glutamato.	90
2.3. Determinación de los niveles de AMPc	94
2.4. Determinación de la concentración de calcio citosólico	96
2.5. Inmunofluorescencia.	98

2.6. Genotipado.	99
2.7. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	101
2.8. Electrofisiología	104
2.9. Análisis y estadística	107
IV. RESULTADOS	111
1. Inhibición de la liberación de glutamato por el receptor CB1.	111
1.1. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la inhibición por receptores CB1 de la liberación de glutamato inducida por K ⁺	111
1.2. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la expresión del receptor CB1 en sinaptosomas cerebrocorticales.	115
2. Potenciación de la liberación de glutamato por los receptores β adrenérgicos.	116
2.1. Potenciación por receptores β adrenérgicos en corteza cerebral.	117
2.1.1. La potenciación por el receptor β adrenérgico de la liberación de glutamato inducida por KCl 5 mM se pierde en los sinaptosomas cerebrocorticales carentes de la proteína FMRP sin que existan cambios en la expresión del receptor o en su capacidad para inducir la síntesis de AMPc.	117
2.1.2. La potenciación por el activador de la adenilato ciclasa forskolina y por el activador de la proteína Epac 8-pCPT de la liberación de glutamato inducida por KCl 5 mM se pierde en los sinaptosomas carentes de la proteína FMRP.	124
2.1.3. Las sinapsis corticales carentes de FMRP presentan mayor número de vesículas sinápticas en contacto con la membrana presináptica y el isoproterenol no aumenta este número.	126
2.1.4. La ausencia de FMRP incrementa la liberación espontánea de glutamato y ocluye la potenciación inducida por isoproterenol en sinaptosomas cerebrocorticales	129
2.1.5. La ausencia de la proteína FMRP también lleva a la pérdida de la potenciación por receptores β adrenérgicos de la liberación de glutamato inducida con ionomicina	130

2.1.6. Los inhibidores de fosfodiesterasas potencian la liberación espontánea de glutamato en ausencia de FMRP.	134
2.1.7. La disminución de la eficacia del AMPc para potenciar la liberación de glutamato no se debe a la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II.	142
2.1.8. El incremento en la $[Ca^{2+}]_c$ inducido por KCl 10mM está aumentado en ausencia de FMRP y la disminución del calcio extracelular rescata la potenciación por isoproterenol.	143
2.2. Potenciación por receptores β adrenérgicos en cerebelo.	146
2.2.1. La ausencia de FMRP incrementa la liberación espontánea de glutamato y ocluye la potenciación inducida por isoproterenol en sinaptosomas de cerebelo, aunque no afecta a la expresión de los β ARs ni a la síntesis de AMPc.	147
2.2.2. La ausencia de la proteína FMRP incrementa la frecuencia de las mEPSCs basalmente y ocluye la potenciación por el receptor β adrenérgico.	150
2.2.3. Las sinapsis cerebelares carentes de la proteína FMRP presentan mayor número de vesículas sinápticas en contacto con la membrana presináptica y el isoproterenol no aumenta este número.	152
2.2.4. La LTP de las sinapsis PF-PC requiere la activación de los β ARs y un aumento en el tamaño del RRP y se pierde en las sinapsis <i>Fmr1</i> KO.	154
2.2.5. La reducción de la concentración de calcio extracelular rescata la potenciación por receptores β adrenérgicos de la frecuencia de las mEPSCs en las sinapsis PF-PC de cerebelo carentes de la proteína FMRP.	157
2.2.6. La reducción de la concentración de calcio extracelular rescata la LTP y normaliza el tamaño del RRP en las sinapsis PF-PC de cerebelo carentes de la proteína FMRP.	158
3. Modulación dual de la liberación de glutamato por el receptor mGlu7.	161

3.1. La inhibición por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por K ⁺ 30 mM no está alterada en sinaptosomas cerebrocorticales KO para <i>Fmr1</i>	162
3.2. La potenciación por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por K ⁺ 5 mM se pierde en los sinaptosomas cerebrocorticales carentes de la proteína FMRP, aunque la expresión del receptor no está alterada..	163
3.3. La disminución de la concentración de Ca ²⁺ extracelular no rescata la potenciación por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por K ⁺ 5 mM.	165
3.4. La potenciación por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por ionomicina no se pierde en los sinaptosomas cerebrocorticales que carecen de la proteína FMRP.	167
V. DISCUSIÓN..	171
1. Funciones presinápticas de FMRP.	173
2. Potenciación de la liberación de glutamato por los β ARs y distribución de VSs en corteza.	174
3. Potenciación de la transmisión sináptica por los β ARs y distribución de VSs en cerebelo.	176
4. La disminución de [Ca ²⁺] _e rescata algunas funciones.	179
5. Los inhibidores de la fosfodiesterasa PDE2A rescatan la potenciación de la liberación por los β ARs.	180
6. Potenciación de la liberación de glutamato por el receptor mGlu7.	183
7. La LTP de las fibras paralelas depende de los β ARs.	185
VI. CONCLUSIONES.	191
VII. BIBLIOGRAFÍA	195

ÍNDICE DE FIGURAS:

INTRODUCCIÓN

- Figura 1. Ciclo vesicular y grupos de vesículas.....	14
-Figura 2. La zona activa.....	16
-Figura 3. Estructura e isoformas de RIM	17
-Figura 4. Estructura e isoformas de Munc13.....	20
-Figura 5. Mecanismos moleculares de la exocitosis.	25
-Figura 6. Receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu7).....	33
-Figura 7. Localización y rutas señalización del receptor CB1	44
-Figura 8. Localización y señalización del receptor β adrenérgico..	49
-Figura 9. Estructura de Epac.....	52
-Figura 10. Estructura del gen <i>Fmr1</i>	61
-Figura 11: Estructura de la proteína FMRP	62

MATERIAL Y MÉTODOS

-Figura 12. Preparación de sinaptosomas	89
-Figura 13. Liberación de glutamato.....	94
-Figura 14. Determinación de los niveles de AMPc.	96
-Figura 15. Determinación de la $[Ca^{2+}]_c$ con Fura-2AM.....	97
-Figura 16. Genotipado	101
-Figura 17. Microscopía electrónica de transmisión.....	102
-Figura 18. Electrofisiología de rodajas de cerebelo.	106

RESULTADOS

-Figura 19. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la inhibición por receptores CB1 de la liberación de glutamato inducida por	
---	--

K ⁺ 30mM.	113
-Figura 20. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la inhibición por receptores CB1 de la liberación de glutamato inducida por K ⁺ 5mM.	114
-Figura 21. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la expresión del receptor CB1 en sinaptosomas cerebrocorticales	116
-Figura 22. La potenciación por el receptor β adrenérgico de la liberación de glutamato inducida por K ⁺ 5mM se pierde en los sinaptosomas cerebrocorticales carentes de la proteína FMRP.	118
-Figura 23. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la expresión del receptor β 1 adrenérgico.	120
-Figura 24. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la expresión de las isoformas de Munc13, aunque sí a la coexpresión de β 1AR con Munc13-2.	122
-Figura 25. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la generación de AMPc inducida por el receptor β adrenérgico o por forskolina en sinaptosomas cerebrocorticales.	123
-Figura 26. La potenciación por el activador de la adenilato ciclasa forskolina de la liberación de glutamato inducida por K ⁺ 5 mM se pierde en los sinaptosomas carentes de la proteína FMRP.	125
-Figura 27. La potenciación por el activador de la proteína Epac 8-pCPT de la liberación de glutamato inducida por K ⁺ 5mM se pierde en los sinaptosomas carentes de la proteína FMRP.	126
-Figura 28. Las sinapsis corticales carentes de FMRP presentan mayor número de vesículas sinápticas en contacto con la membrana presináptica y el isoproterenol no aumenta este número.	128
-Figura 29. La ausencia de FMRP incrementa la liberación espontánea de glutamato y ocluye la potenciación inducida por isoproterenol en sinaptosomas cerebrocorticales carentes de la proteína FMRP.	130
-Figura 30. La potenciación por receptores β adrenérgicos de la liberación de glutamato inducida con ionomicina se pierde en ausencia de la proteína FMRP.	132

-Figura 31. El activador de la adenilato ciclasa forskolina potencia la liberación de glutamato inducida por ionomicina en ausencia de la proteína FMRP.	133
-Figura 32. El activador de la proteína Epac 8-pCPT potencia la liberación de glutamato inducida por ionomicina en ausencia de la proteína FMRP.	134
-Figura 33. El inhibidor de fosfodiesterasas IBMX potencia la liberación espontánea de glutamato en ausencia de FMRP.	135
-Figura 34. El inhibidor de fosfodiesterasas IBMX rescata parcialmente la potenciación por el receptor β adrenérgico de la liberación inducida por ionomicina en ausencia de la proteína FMRP.	137
-Figura 35. El inhibidor de la fosfodiesterasa 2 BAY 60-7570 rescata completamente la potenciación por el receptor β adrenérgico de la liberación inducida por ionomicina en sinaptosomas <i>Fmr1</i> KO.	139
-Figura 36. El Incremento de GMPc inducido por el donador de óxido nítrico DEANO suprime la potenciación inducida por isoproterenol en terminales cerebrocorticales WT.	140
-Figura 37. El inhibidor de la fosfodiesterasa 4 rolipram no rescata la potenciación por el receptor β adrenérgico de la liberación inducida por ionomicina en sinaptosomas <i>Fmr1</i> KO.	141
-Figura 38. La disminución de la eficacia del AMPc para potenciar la liberación de glutamato inducida por ionomicina en ausencia de FMRP no se debe a la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II.	143
-Figura 39. La estimulación con KCl 10 mM induce un mayor incremento en la $[Ca^{2+}]_c$ en los sinaptosomas carentes de FMRP ...	145
-Figura 40. La disminución de la concentración extracelular de Ca^{2+} reduce la liberación espontánea y rescata la potenciación por isoproterenol en ausencia de la proteína FMRP.	146
-Figura 41. La ausencia de FMRP incrementa la liberación espontánea de glutamato y ocluye la potenciación inducida por isoproterenol en sinaptosomas de cerebelo.	148

-Figura 42. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la expresión del receptor $\beta 1$ adrenérgico en sinaptosomas de cerebelo.....	149
-Figura 43. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la generación de AMPc inducida por el receptor β adrenérgico o por forskolina en sinaptosomas de cerebelo.....	150
-Figura 44. La ausencia de la proteína FMRP incrementa la frecuencia de las mEPSCs basalmente y ocluye la potenciación por del receptor β adrenérgico.	151
-Figura 45. Las sinapsis cerebelares carentes de la proteína FMRP presentan mayor número de vesículas sinápticas en contacto con la membrana presináptica y el isoproterenol no aumenta este número	153
-Figura 46. La PF-PC LTP requiere la activación de los receptores β adrenérgicos presinápticos y se pierde en las rodajas de cerebelo carentes de la proteína FMRP.....	155
- Figura 47. La ausencia de proteína FMRP incrementa el tamaño del RRP y la inducción de la LTP no lo aumenta más.....	156
-Figura 48. La reducción de la concentración de calcio extracelular rescata la potenciación por receptores β adrenérgicos de la frecuencia de las mEPSCs en las sinapsis PF-PC de cerebelo carentes de la proteína FMRP.	158
-Figura 49. La reducción de la concentración de calcio extracelular rescata la LTP de las sinapsis PF-PC de cerebelo carentes de la proteína FMRP.....	159
-Figura 50. La reducción de la concentración de calcio extracelular reduce el tamaño del RRP y rescata el incremento inducido por la LTP de las sinapsis PF-PC de cerebelo carentes de la proteína FMRP ...	160
-Figura 51. La inhibición por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por K^+ 30 mM no está alterada en sinaptosomas cerebrocorticales KO para <i>Fmr1</i>	163
-Figura 52. La potenciación por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por K^+ 5 mM se pierde en los sinaptosomas cerebrocorticales carentes de la proteína FMRP.	164

-Figura 53. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la expresión del receptor mGlu7 en sinaptosomas cerebrocorticales.	165
-Figura 54. La potenciación por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por K ⁺ 5 mM no se recupera disminuyendo la concentración del calcio extracelular en ausencia de FMRP y desaparece en el genotipo silvestre	166
-Figura 55. La potenciación por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por ionomicina no se pierde en los sinaptosomas cerebrocorticales que carecen de la proteína FMRP.	168

DISCUSIÓN

-Figura 56. Alteraciones encontradas en terminales sinápticos <i>Fmr1</i> KO.	172
--	-----

ÍNDICE DE TABLAS:

INTRODUCCIÓN

-Tabla 1. Tipos de PDEs, afinidad, regulación y regiones de mayor expresión en el SNC .	57
---	----

-Tabla 2. Algunas proteínas reguladas por FMRP	65
--	----

MATERIAL Y MÉTODOS

-Tabla 3. Reactivos y materiales	82
----------------------------------	----

-Tabla 4. Fármacos	84
--------------------	----

-Tabla 5. Medios	85
------------------	----

-Tabla 6. Equipos	86
-------------------	----

ABREVIATURAS:

8-pCPT	8-pCPT-2'O-Me-cAMP.
AC	adenilato ciclasa.
ADA	adenosina desaminasa.
2-AG	2-araquidonilglicerol
AMPc/cAMP	adenosín 3',5'-monofosfato cíclico.
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazolil-4 propionato.
AP/PA	potencial de acción (pulso cuadrado de estimulación eléctrica de campo de 1ms y 10V/cm).
ATP	adenosín trifosfato.
β AR	receptores β adrenérgicos.
BK	canales de potasio activados por calcio
BSA	albúmina de suero bovino.
C57BL/6J	fondo genético de cepa de ratones.
$[Ca^{2+}]_e$	concentración de calcio extracelular.
$[Ca^{2+}]_c$	concentración de calcio citosólico.
CaM	calmodulina.
CaMK	calmodulina quinasa.
DAG	diacilglicerol.
DAGL	diacilglicerol lipasa
DAGK	diacilglicerol quinasa
DEANO	Dietilamino nonoato
DVs	<i>Docked vesicles</i> (vesículas sinápticas amarradas a la membrana de la zona activa)
DTT	ditiotreitól.
dNTP	desoxinucleótido trisfosfato.
EAAT	transportador de aminoácidos excitadores.

EDTA	ácido etilendiaminotetraacético.
EGTA	ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)- N, N, N', tetraacético.
Epac	proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina activada por cAMP.
EPSC	corriente postsináptica excitadora.
FMRP	proteína de retraso mental asociada al X frágil
Forsk	forskolina: (3R,4aR,5S,6S,6aS,10S,10aR,10bS)-6,10,10b-trihidroxi-3,4a,7,7,10a-pentametil-1-oxo-3-vinildodecahidro-1H-benzo[f]cromen-5-il acetato.
FRET	transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.
Fura 2-AM	éster Fura-2-acetoximetil
FXS	síndrome del X frágil.
GABA	ácido gamma amino butírico.
GDH	glutamato deshidrogenasa.
GEF	factor intercambiador de nucleótidos de guanina.
GFP	proteína verde fluorescente.
GIRK	canales responsables de la corriente rectificadora de entrada de K ⁺ modulados por proteínas G.
Glu	glutamato
GMPc	guanosín monofosfato cíclico
GTP	guanosín trifosfato
GPCR	receptores acoplados a proteínas G.
GTP/GDP	guanosín tri/difosfato.
HBM	medio tamponado con HEPES.
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetil sulfónico.
HFS	estimulación de alta frecuencia.
HU-210	análogo sintético del THC
IBMX	3-isobutilmetilxantina.
IP ₁	inositol monofosfato.

IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfato.
IPSC	corriente postsináptica inhibitoria.
KCl	cloruro potásico.
A-KG	α -cetoglutarato
KO	knockout: modelo animal modificado genéticamente con ausencia de expresión de una proteína.
L-AP4	ácido-L-(+)-2-amino-4-fosfonobutírico.
LTP/LTD	potenciación/depresión sináptica a largo plazo.
mEPSC	corriente postsináptica excitadora miniatura
mGlu	receptor metabotrópico de glutamato.
NADP/H	forma oxidada/reducida del dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato.
NE	norepinefrina.
NGS/NDS	suero normal de cabra/burro.
NMDA	N-metil-D-aspartico.
PB	tampón fosfato.
PBS	tampón fosfato salino.
PCR	reacción en cadena de la polimerasa.
PDE	fosfodiesterasa.
PFA	paraformaldehído.
PF-PC	sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje
PIP2	fosfatidil inositol 4,5 bifosfato.
PKA	proteína quinasa A o dependiente de cAMP.
PKC	proteína quinasa C.
PLC	fosfolipasa C.
PPR	cociente de pulsos apareados.
Prop	propranolol: (RS)-1-(isopropilamino)-3-(naftalen-1-iloxi)propan-2.

PTx	tóxina pertúsica.
Rab	proteína análoga a Ras en cerebro.
RIM	molécula de interacción con Rab.
RIM-BP	proteína de unión a RIM.
ROI	región de interés.
RRP	grupo de SVs preparadas para su liberación.
SDS	dodecil sulfato sódico.
SNAP	proteína soluble unida a NSF (proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida).
SNARE	receptores de SNAP.
SNC	sistema nervioso central.
STP/STD	potenciación /depresión sináptica a corto plazo.
SVs	vesículas sinápticas.
Syphy	sinaptofisina
TAE	tampón de electroforesis
TBS	tampón tris salino.
THC	tetrahidrocannabinol
Tris	tris(hidroximetil)aminometano.
TTx	tetrodotoxina.
v-ATPasa	ATPasa vacuolar.
VDCC	canales de calcio dependientes de voltaje.
VDF	dominio “venus atrapamoscas”
VS/SV	vesícula sináptica
vGlut	transportador vesicular de glutamato.
WT	genotipo salvaje.
ZA	zona activa

RESUMEN
SUMMARY

RESUMEN:**CONTROL PRESINÁPTICO POR RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G, GPCRs, EN UN RATÓN MODELO DEL SÍNDROME DEL X FRÁGIL.****Introducción.**

El síndrome del X frágil (FXS) es la enfermedad mental de carácter hereditario más importante y se asocia con alteraciones como déficits cognitivos, hiperactividad, ansiedad y problemas de interacción social. En el FXS se produce un silenciamiento del gen *Fmr1* que codifica para la proteína FMRP, que regula la expresión génica mediante su interacción con ARNm. Cuando FMRP está ausente, se produce una alteración en la expresión de gran cantidad de proteínas postsinápticas así como en formas de plasticidad a largo plazo. Además, FMRP se localiza en axones y en el terminal presináptico donde también regula la expresión de múltiples proteínas presinápticas.

Los receptores CB1, β adrenérgico (β ARs) y metabotrópico de glutamato 7 (mGlu7) se localizan a nivel presináptico donde modulan la liberación de glutamato mediante su acoplamiento a proteínas G. Los receptores CB1 modulan proteínas Gi/o, por lo que su activación conlleva una reducción de la liberación de neurotransmisor, ya que inhiben a la AC y a los VDCCs. Los β ARs están acoplados a una proteína Gs, e incrementan la liberación de glutamato por aumento del AMPc y activación de la proteína Epac. Esto resulta en la traslocación de la proteína Munc13-1 y en un incremento en el número de VSs en contacto con la membrana de la zona activa (DVs del inglés *docked vesicles*). Los receptores mGlu7 ejercen una modulación dual de la liberación de glutamato inhibiéndola, mediante su acoplamiento a proteínas Gi/o, o potenciándola mediante la interacción con proteínas G resistentes a toxina

pertussis que activan a la fosfolipasa C. Esta vía, aumenta los niveles de DAG y trasloca Munc13, lo que, a su vez, incrementa la liberación de glutamato.

No existe conocimiento de que la modulación de la liberación de glutamato mediada por estos receptores esté afectada en FXS, sin embargo, la ausencia de FMRP provoca cambios que pueden afectar a la función de los mismos. Estudios previos han descrito un incremento en el número de DVs, probablemente por aumento de los niveles de DAG por la ausencia de la DAG quinasa en el FXS. Además, la ausencia de FMRP alarga el potencial de acción y aumenta en la entrada de calcio, lo que contribuye a incrementar la liberación de neurotransmisor. Otros estudios, realizados tanto en pacientes del FXS como en ratones *Fmr1* KO, han señalado una disminución en la síntesis de AMPc que se revierte sobreexpresando FMRP. Asimismo, formas de LTP presinápticas dependientes de AMPc, como la que se expresa en la corteza cingulada anterior, se pierden en ratones *Fmr1* KO.

En esta Tesis Doctoral se han utilizado preparaciones de sinaptosomas de corteza cerebral y cerebelo así como rodajas de cerebelo procedentes de animales WT y *Fmr1* KO y con técnicas bioquímicas, de biología molecular, fluorescencia, inmunofluorescencia, microscopía electrónica y electrofisiología se han planteado los siguientes **objetivos**:

- Conocer si la ausencia de la proteína FMRP altera la modulación de la liberación de glutamato por los receptores CB1, β ARs y mGlu7 y si estos cambios afectan a la expresión y/o señalización de dichos receptores.

- Estudiar la distribución de vesículas sinápticas en ratones *Fmr1* KO.

- Determinar si la ausencia de la proteína FMRP afecta a formas de plasticidad presinápticas que requieran un aumento de la liberación neurotransmisor.

Resultados.

Hemos encontrado que la liberación de glutamato en terminales corticales de ratones *Fmr1* KO inducida por una estimulación moderada (KCl 5 mM) no se potencia por el agonista de los β ARs isoproterenol ni por el activador de la adenilato ciclasa forskolina o por el activador de Epac 8-pCPT, a pesar de que no se producen cambios en la expresión del receptor ni en su capacidad para inducir la síntesis de AMPc. Los ratones *Fmr1* KO presentan un mayor número de DVs y el isoproterenol no aumenta este número, por lo que parece existir una incapacidad de los β ARs para movilizar vesículas. Sin embargo, una estimulación más débil con ionomicina recupera la potenciación mediada por forskolina y 8-pCPT, aunque no la de isoproterenol, lo que revela el problema adicional de la ineficacia del AMPc para activar la vía. De acuerdo con esto, la inhibición de la PDE2A recupera la potenciación de la liberación de glutamato en sinaptosomas *Fmr1* KO.

Hemos observado que tanto la potenciación de la liberación de glutamato inducida por isoproterenol en los sinaptosomas de cerebelo *Fmr1* KO como la LTP de las sinapsis entre fibras paralelas y células de Purkinje (PF-PC) dependiente de AMPc también se pierden en ratones *Fmr1* KO. El mayor número de DVs y el mayor RRP de las sinapsis *Fmr1* KO es compatible con una mayor liberación espontánea y la ausencia de potenciación mediada por isoproterenol. Esta oclusión de la potenciación de las sinapsis *Fmr1* KO se revirtió mediante una disminución del calcio extracelular, que a su vez reestableció la distribución de VSs y la PF-PC LTP.

Finalmente, hemos encontrado que la modulación de la liberación de glutamato mediada por los receptores CB1 no está alterada en preparaciones *Fmr1* KO y que la potenciación de la liberación inducida por el agonista de mGlu7 L-AP4 solo se observa con estímulos débiles.

Conclusiones.

- La potenciación de la liberación de glutamato por los β ARs se pierde en los ratones *Fmr1* KO por incapacidad del receptor para movilizar vesículas sinápticas hacia la membrana de la zona activa presináptica.

- Las sinapsis *Fmr1* KO presentan una menor eficacia del AMPc para activar la vía de señalización que induce la potenciación. Esta potenciación se recupera mediante el uso de inhibidores de la PDE2A.

- La LTP de las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje del cerebelo se pierde en los ratones *Fmr1* KO. La disminución de la concentración de Ca^{2+} extracelular rescata esta LTP.

- La inhibición de la liberación de glutamato mediada por el receptor CB1 no está alterada en ratones *Fmr1* KO.

- La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la eficacia de la señalización de los receptores mGlu7, de ahí que la potenciación de la liberación por estos receptores se recupere con una estimulación débil de los sinaptosomas.

SUMMARY:**PRESYNAPTIC MODULATION MEDIATED BY G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS, GPCRs, IN A MOUSE MODEL OF FRAGILE X SYNDROME.****Introduction.**

Fragile X syndrome (FXS) is the most common inherited intellectual disability and it is associated with multiple behavioral alterations, including cognitive deficits, hyperactivity, anxiety and deficits in social behavior. In FXS, the *Fmr1* gene that encodes the fragile mental retardation protein (FMRP) is silenced. FMRP modulates gene expression through changes in the stability and transport of its mRNA targets. When FMRP is absent the expression of many postsynaptic proteins is altered as well as postsynaptic long-term forms of plasticity. FMRP is also found in axons and presynaptic nerve terminals and mRNA targets encoding for presynaptic proteins were identified.

CB1, β adrenergic (β ARs) and metabotropic glutamate 7 (mGlu7) are presynaptic receptors modulating glutamate release through their coupling with G proteins. CB1 receptors are coupled with Gi/o protein and reduce neurotransmitter release because of the inhibition of adenylyl cyclase and voltage dependent calcium channels. β ARs enhance neurotransmitter release through Gs protein generation of cAMP and the ensuing activation of the guanine nucleotide exchange protein directly activated by cAMP (Epac). This signaling also involves Munc13-1 translocation and an increase in the number of docked synaptic vesicles (DVs). mGlu7 receptors have a dual modulation of glutamate release since they can couple with a Gi/o protein to inhibit neurotransmitter release or with a pertussis-resistant G protein to activate phospholipase C and to increase diacylglycerol (DAG) levels. This second messenger allows Munc13 translocation that will result in the glutamate release enhancement.

It is unknown whether glutamate release modulation mediated by these receptors is impaired at *Fmr1* KO synapse. However, the lack of FMRP causes changes in presynaptic function that may affect these GPCRs. Previous studies have shown an increase in the number of DVs probably related to higher levels of DAG due to the loss of DAG kinase in FXS. Furthermore the loss of FMRP enlarges the action potential (AP) and the ensuing influx of Ca^{2+} which also contributes to the enhanced neurotransmitter release at synapses lacking FMRP. Other studies have shown a decreased cAMP production in cells from fragile X patients and *Fmr1* KO mice that can be reverted by FMRP overexpression. In addition, a form of cAMP-dependent LTP that is expressed presynaptically is impaired in *Fmr1* KO mice.

In this work, cortical and cerebellar synaptosomes as well as cerebellar slices from WT and *Fmr1* KO mice were used and by means of biochemical, molecular biology, fluorescence, immunofluorescence, electronmicroscopy and electrophysiological techniques we have pursued the following **goals**:

- To study the effect of the lack of FMRP in expression, signaling and modulation of glutamate release mediated by CB1, β adrenergic and mGlu7 receptors.

- To analyze the distribution of synaptic vesicles in *Fmr1* KO mice.

- To understand if the absence of FMRP could affect forms of presynaptic plasticity which require an enhancement of the neurotransmitter release.

Results.

We found that the glutamate release at *Fmr1* KO cerebrocortical nerve terminals induced by a moderate stimulation (5 mM KCl) is not potentiated by the β AR agonist isoproterenol, nor by the adenylyl cyclase activator forskolin or the Epac activator 8-pCPT, despite the normal β AR expression and cAMP generation. *Fmr1* KO synapses have more DVs and isoproterenol fails to

enhance docking. So, the recruitment of more SVs for release appears to be impeded. Interestingly, weaker stimulation of synaptosomes with the Ca^{2+} ionophore ionomycin recovered the release potentiation driven by forskolin and 8-pCPT but not by isoproterenol, revealing an impaired efficiency of receptor generated cAMP to activate the release potentiation pathway. Indeed, inhibiting cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE2A with BAY 60-7550 reestablished isoproterenol mediated potentiation in *Fmr1* KO synaptosomes.

We also found that the potentiation of glutamate release induced by isoproterenol is absent at cerebellar nerve terminals from *Fmr1* KO mice, even though β AR expression and cAMP generation remains unaltered. Interestingly, we found that cAMP-dependent presynaptic Long Term Potentiation (LTP) at parallel fiber to Purkinje cell (PF-PC) synapses is absent in cerebellar slices from *Fmr1* KO animals. These PF-PC synapses in *Fmr1* KO mice have more DVs and a larger readily releasable pool (RRP) of vesicles than wild type synapses. This change in SVs distribution is compatible with a larger spontaneous release of PF-PC *Fmr1* KO synapses and the lack of potentiation by the β AR agonist isoproterenol. The occlusion of spontaneous release potentiation found in *Fmr1* KO synapses was reversed by diminishing extracellular Ca^{2+} concentration, which also rescued SV distribution and PF-PC LTP.

Finally we observed that the modulation of glutamate release mediated by CB1 receptors is not altered in *Fmr1* KO synapses. However the enhancement of glutamate release induced by the mGlu7 receptor agonist L-AP4 only occurs under weak stimulations at *Fmr1* KO synapses.

Conclusions.

-The lack of β AR mediated potentiation of glutamate release is the consequence of the impaired receptor capability to mobilize SVs to the active zone (AZ) of the plasma membrane.

-There is an impairment in the efficiency of cAMP generated by β AR to activate the signaling pathway that enhances neurotransmitter release that is restored by using PDE2A inhibitors.

-The LTP at PF-PC synapses depends on β AR activation and is absent in *Fmr1* KO mice. This impairment in synaptic transmission was reversed by diminishing extracellular Ca^{2+} concentration.

-The inhibition of glutamate release mediated by CB1 receptor is not altered in *Fmr1* KO mice.

-The lack of FMRP does not affect the mGlu7 receptor signaling and consequently release potentiation is recovered under weak stimulation protocols.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN:

1. Las sinapsis glutamatérgicas.

La comunicación entre neuronas es un proceso complejo y altamente especializado que tiene lugar en las sinapsis, que pueden ser eléctricas o químicas. Las primeras se establecen por medio de uniones directas entre las neuronas denominadas uniones de hendidura (del inglés *Gap Junctions*), que son canales proteicos que permiten el paso de iones y otros metabolitos de hasta 1 kD de tamaño.

En las sinapsis químicas la comunicación entre neuronas se establece por medio de la liberación de un neurotransmisor. La llegada de un potencial de acción (PA) a un botón sináptico provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje VDCCs (del inglés *Voltage-Dependent Calcium Channels*), y el aumento de la concentración de Ca^{2+} en la zona activa induce la exocitosis de las vesículas sinápticas (VSs) y la salida del neurotransmisor a la hendidura sináptica donde difunde, activando los receptores postsinápticos. En las sinapsis glutamatérgicas (excitadoras) la activación de los receptores despolariza la neurona postsináptica, mientras que, en las sinapsis GABAérgicas (inhibidoras), la hiperpolariza. Las neuronas postsinápticas integran, temporal y espacialmente, las pequeñas despolarizaciones e hiperpolarizaciones que reciben a través de las sinapsis y, cuando en el segmento inicial del axón o cono axónico se alcanza una despolarización suficiente para activar los canales de Na^{+} dependientes de voltaje, se genera un PA que se propaga a lo largo del axón.

1.1. El glutamato y su liberación.

El glutamato es un aminoácido capaz de actuar como neurotransmisor. Se sintetiza en el cerebro a partir de diversos precursores, siendo los más

importantes la glutamina y el α -cetoglutarato (α KG). Una vez liberado por las sinapsis glutamatérgicas, es captado mayoritariamente por los astrocitos y convertido en glutamina por medio de la glutamina sintetasa. Esta glutamina es liberada por las células gliales y, una vez en el terminal presináptico, es metabolizada a glutamato por el enzima mitocondrial glutaminasa. El glutamato también se sintetiza por medio de transaminasas como la aspartato aminotransferasa o la alanina aminotransferasa que convierten el α KG en glutamato en una síntesis acoplada a la transformación de aspartato en oxalacetato o de alanina a piruvato respectivamente (Kandel, 2000).

Las vesículas sinápticas son capaces de almacenar glutamato (100-150 mM) (Hayashi, 2018) por medio de los transportadores vesiculares específicos (VGluT1-3), si bien, solo VGluT1 y 2 son marcadores de las vías glutamatérgicas. Para este transporte acumulativo, los VGluT1-3 utilizan el gradiente electroquímico generado por la bomba de protones V-ATPasa (Tabb *et al.*, 1992). A diferencia de lo que ocurre con otros neurotransmisores como el GABA, el transporte de glutamato parece depender específicamente del componente eléctrico del gradiente electroquímico de protones (Omote *et al.*, 2011).

La mayor parte del glutamato liberado durante la neurotransmisión es captado por las células de glía, que expresan los transportadores de glutamato dependientes de Na^+ EAAT-1 y 2, aunque algunos botones sinápticos del hipocampo también expresan EAAT-2. Los transportadores de glutamato EAAT 3-5 son de expresión mayoritariamente neural y de localización postsináptica, encontrándose EAAT4 y EAAT5 en las células de Purkinje del cerebelo y de la retina, respectivamente (Vandenberg & Ryan, 2013)

1.1.1. El ciclo vesicular

El ciclo de las vesículas sinápticas comprende una serie de etapas de tráfico intracelular que comienzan con la colocación de las vesículas sinápticas

en las proximidades de la membrana de la zona activa, la adquisición de competencia por parte de las mismas para la exocitosis, su fusión con la membrana plasmática y la posterior escisión de la vesícula por endocitosis, seguida de la re-acidificación del interior vesicular y de la carga de la vesícula con el neurotransmisor (Figura 1A). De este modo, los botones sinápticos son capaces de llevar a cabo rondas repetidas de exocitosis tras la llegada de los potenciales de acción.

Las VSs de un botón sináptico no son equivalentes desde un punto de vista funcional. Se han propuesto 3 grupos de vesículas sinápticas (Figura 1B): el grupo de vesículas listo para ser liberado (RRP, del inglés *Readily Releasable Pool*), el de reciclamiento y el de reserva (Rizzoli & Betz, 2005). El conjunto de VSs del grupo de reciclamiento y las del RRP pueden agruparse en un único grupo denominado grupo de reciclamiento total. Ante la llegada de un estímulo se producirá la liberación inmediata de las vesículas que forman el RRP, que son las VSs que están en contacto con la membrana plasmática de la zona activa. Los siguientes estímulos favorecerán la liberación de las vesículas que componen el grupo de reciclamiento. Las vesículas del grupo de reserva no son liberadas con estímulos fisiológicos y únicamente se fusionan con la membrana bajo condiciones de estimulación fuertes, cuando las vesículas de grupo de reciclamiento están agotadas. Salvo en el caso del RRP, no se ha determinado la relación entre la posición ultraestructural de las VSs y su clasificación funcional. Además, se ha definido un cuarto grupo de VSs, denominado de intercambio intersináptico, en el que los diferentes botones sinápticos que constituyen un terminal axónico comparten vesículas que formarían parte de un *superpool* de vesículas sinápticas altamente móviles y con capacidad de intercambiarse rápidamente entre terminales sinápticos (Staras & Branco, 2010; Staras *et al.*, 2010).

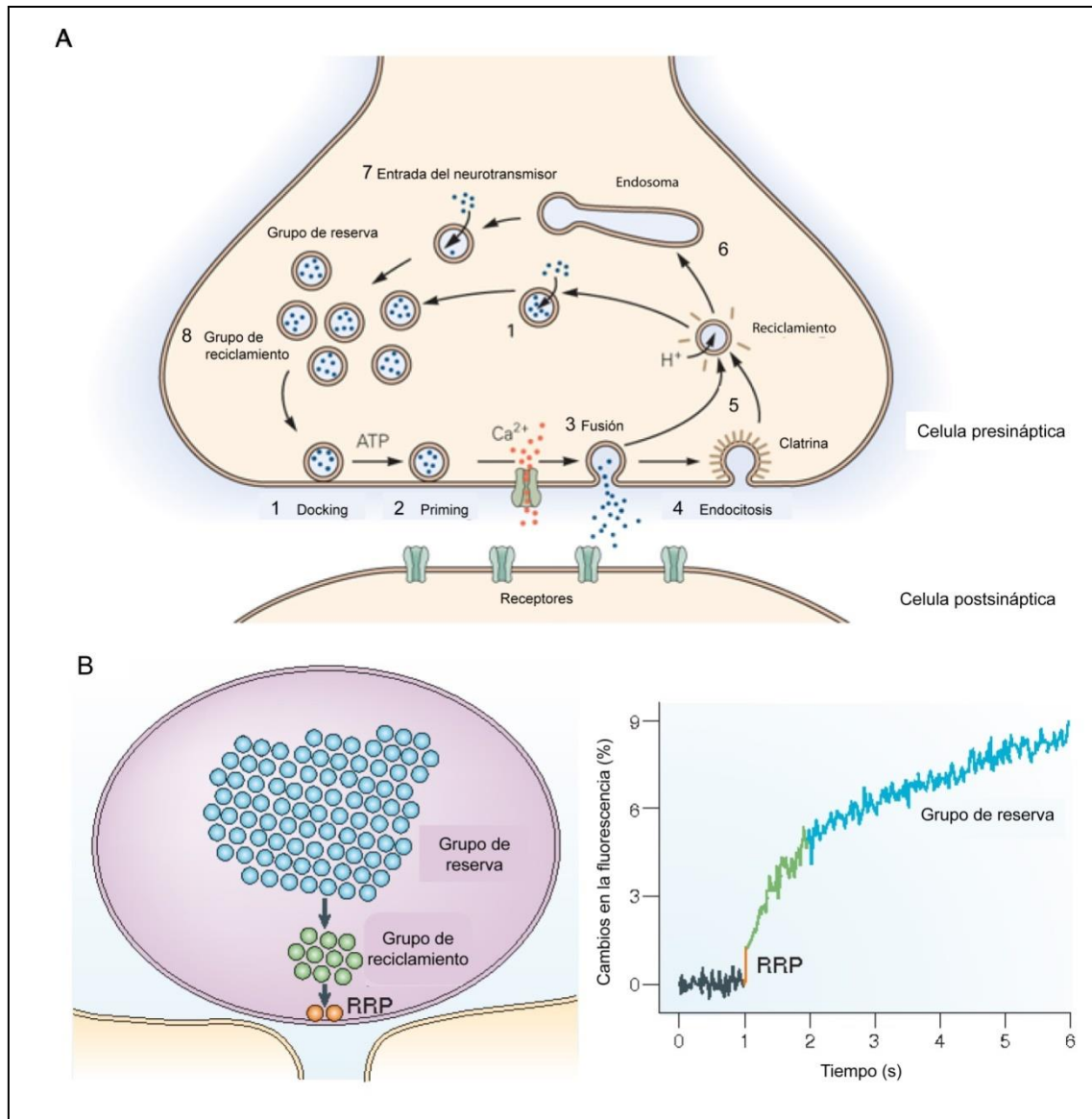


Figura 1. Ciclo vesicular y grupos de vesículas. (A) El ciclo de las vesículas se inicia con la colocación de las vesículas en la zona activa (1), seguida de su preparación para llevar a cabo la fusión (2) y la liberación del neurotransmisor ante la entrada de calcio (3). Posteriormente se produce la endocitosis (4), escisión (5) y reciclamiento (6) de las vesículas para su posterior reacidificación y llenado del neurotransmisor (7), incorporándose finalmente al grupo de reciclamiento (8). (B) La distribución de las VSs dentro del terminal presináptico se subdivide en distintos grupos (RRP, reciclamiento y reserva) que difieren en el estímulo que promueve su liberación ya que el RRP se libera de manera inmediata ante la llegada de un estímulo, el grupo de reciclamiento se liberará ante estímulos repetidos y el de reserva, ante estímulos muy fuertes cuando el grupo de reciclamiento está agotado. Esquemas basados en (Kandel, 2000; Rizzoli & Betz, 2005).

1.1.2. La zona activa.

La zona activa (Figura 2A) es el área de la membrana presináptica con la que las VSs entran en contacto y donde se produce la fusión vesicular. Las zonas activas tienen varias funciones en relación con la liberación del neurotransmisor. En primer lugar, albergan la maquinaria exocitótica, que permite la colocación de las VSs en las proximidades de la membrana presináptica, así como la preparación de las mismas para la fusión y exocitosis del neurotransmisor. Además, ayudan a reclutar los canales de calcio dependientes de voltaje próximos a las VSs lo que permite el acoplamiento entre la entrada de Ca^{2+} y la exocitosis. Las zonas activas presentan cinco proteínas principales (RIM, Munc13, RIM-BP, α -liprinas y ELKS) y los VDCCs (Figura 2B). Además, hay otras proteínas asociadas, como Piccolo y Basoon, que constituyen la citomatriz de la zona activa (Limbach *et al.*, 2011), así como receptores presinápticos como los metabotrópicos de glutamato de tipo III (Shigemoto *et al.*, 1996). Las zonas colindantes a la zona activa se denominan zonas perisinápticas. En estas regiones tienen lugar los procesos de endocitosis de las VSs (Brodin & Shupliakov, 2006) y, en ellas, se localizan algunas de las moléculas de adhesión celular que permiten la aposición con la postsinapsis (Uchida *et al.*, 1996) además de algunos receptores presinápticos (Nyiri *et al.*, 2005).

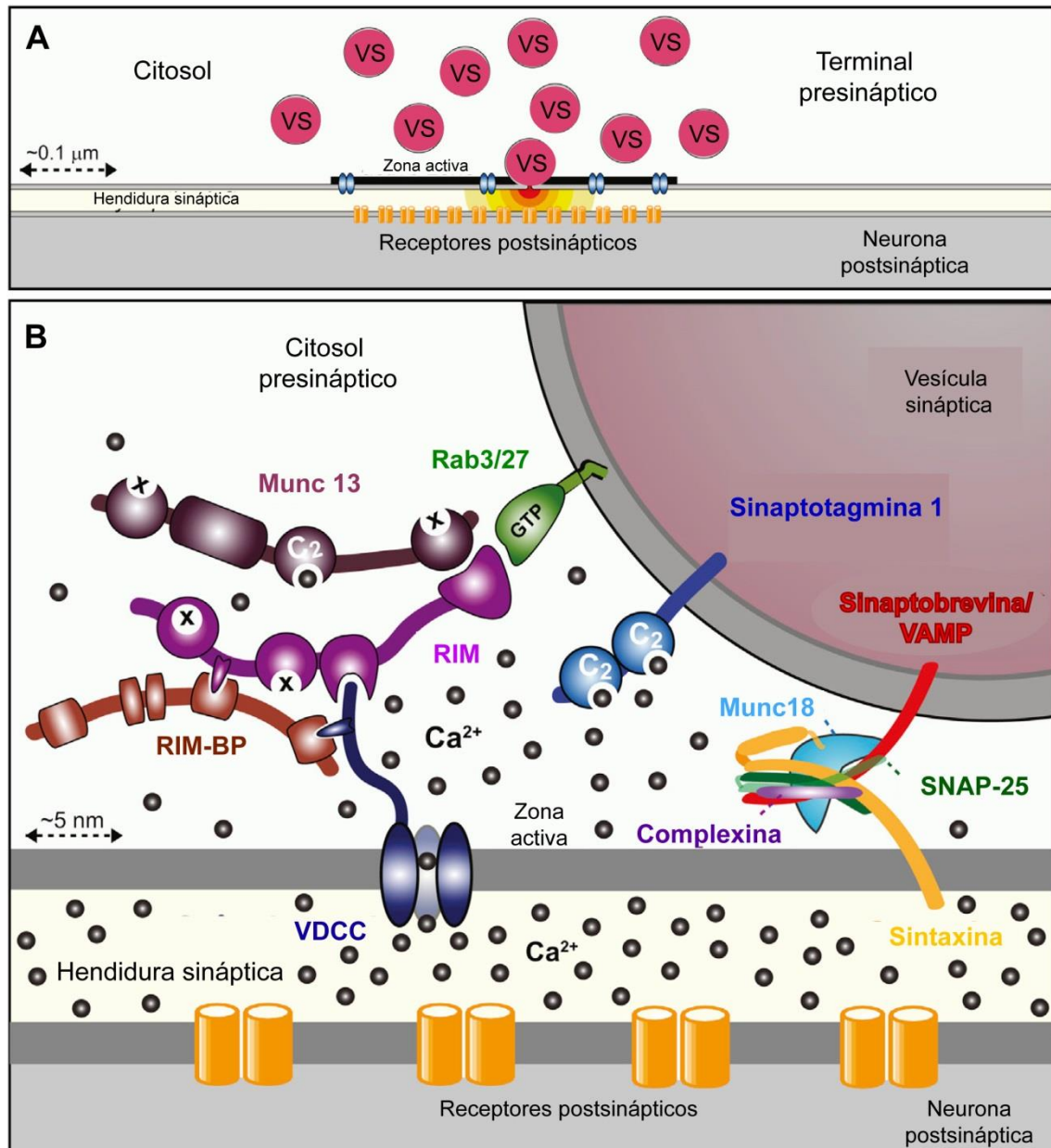


Figura 2. La zona activa. (A) esquema del terminal presináptico en el que se indica dónde está la zona activa, que es la región de la membrana presináptica donde se van a fusionar las VSs para la exocitosis. (B) representación de las proteínas de la zona activa que componen la maquinaria exocitótica y sus respectivas interacciones. La aproximación de las vesículas se inicia con la formación del complejo Munc13-RIM-Rab3 y la formación de un complejo entre la sinaptobrevina, sintaxina-1 y SNAP-25 denominado complejo SNARE. La proteína RIM participa en el reclutamiento de los VDCCs para que la fusión de la vesícula tenga lugar cuando se produzca la entrada de calcio gracias a la sinaptotagmina que actúa como un sensor para este ión. Basado en (Sudhof, 2013).

RIM

Las proteínas RIM (del inglés *Rab3-Interacting Molecules*) presentan 4 isoformas principales (Figura 3) con distintas variantes: RIM1 (α y β) RIM2 (α , β y γ), RIM3 γ y RIM4 γ . Las isoformas largas, RIM1 α y RIM2 α , contienen 5 dominios: el N-terminal, con estructura en de dedos de zinc rodeados por α hélices que incluye una secuencia de unión a Rab-3, un dominio PDZ, dos dominios C2 que no unen iones de calcio, aunque permiten su interacción con los VDCCs, y una secuencia rica en prolina que conecta los dos dominios C2. El resto de las isoformas no presentan todos los dominios (Sudhof, 2012) (Figura 3).

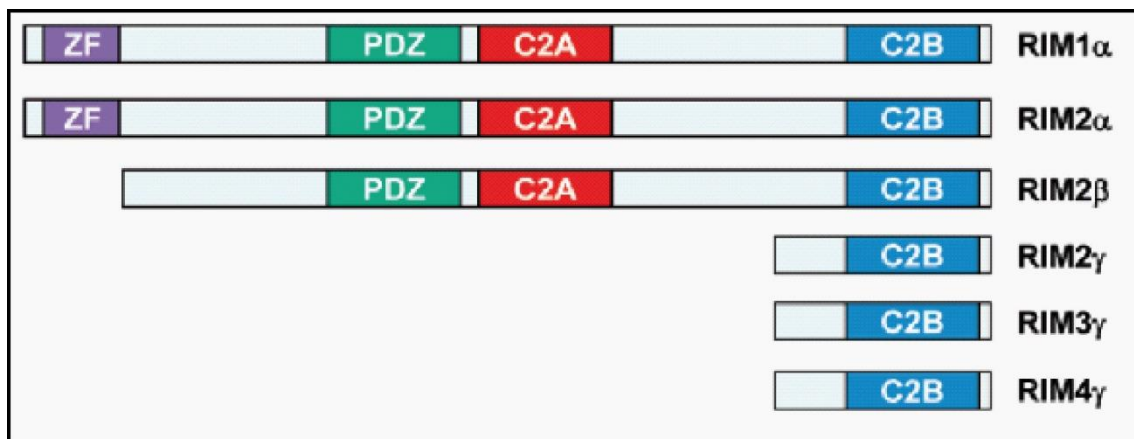


Figura 3. Estructura e isoformas de RIM. La proteína RIM presenta 4 isoformas principales (1, 2, 3 y 4) que, a su vez, tienen distintas variantes (α , β y γ). RIM1 α y RIM2 α son las isoformas largas y poseen la estructura de dedos de zinc en el extremo N-terminal (ZF) con los que unen Munc13, un dominio PDZ y dos dominios C2 (A y B) con los que interaccionará con los VDCCs (Guan *et al.*, 2007).

Las proteínas RIM son un componente central de la presinapsis, ya que interaccionan directa o indirectamente con la mayoría de las proteínas de la zona activa. Las isoformas largas RIM1 α y RIM2 α , mediante la estructura de dedos de Zn^{2+} , unen Munc13-1 y ubMunc13-2, mientras que las hélices α que rodean al mismo unen Rab3 y Rab27 de manera dependiente de GTP (Wang *et al.*, 2000). Este complejo heterotrimérico entre RIM, Munc13 y Rab3 o Rab27 es el que podría acercar y amarrar las vesículas a la membrana plasmática (Kaesler,

2011). Por medio de este dominio tipo dedos de Zn^{2+} , las proteínas RIM 1 α y 2 α interaccionan con el dominio C2A de Munc13 favoreciendo la formación del heterodímero activo de Munc13 (Betz *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2011a). Esta interacción ayuda, probablemente, a la localización de Munc13 en la membrana plasmática (Kaeser *et al.*, 2008b; Deng *et al.*, 2011a). Por tanto, RIM ayuda a formar un heterodímero RIM/Munc13 activo que permite poner en marcha la función de Munc13 (Kaeser *et al.*, 2011), consistente en promover la conformación abierta de syntaxina y la formación del complejo SNARE (Ma *et al.*, 2011).

Las proteínas RIM ayudan a localizar los VDCCs en la zona activa (Kaeser *et al.*, 2011; Acuna *et al.*, 2016) mediante interacciones directas e indirectas. Por el dominio C2B carboxilo terminal, interacciona con la subunidad $\beta 4$, presente en todos los tipos de canales de Ca^{2+} (Uriu *et al.*, 2010). Por el dominio PDZ central, RIM interacciona con secuencias citoplasmáticas del carboxilo terminal de los canales de Ca^{2+} del tipo P/Q y N (Kaeser *et al.*, 2011) y mediante sus dominios C2A y C2B, con la subunidad $\alpha 1B$ de los canales del tipo N (Coppola *et al.*, 2001) (Figura 3). Además de la unión directa con los canales de Ca^{2+} , las proteínas RIM también se unen a ellos por medio de la proteína de unión a RIM, RIM-BP (del inglés *RIM-Binding Protein*), por la secuencia rica en prolina, ayudando a localizar a los canales de Ca^{2+} en la zona activa.

Las proteínas RIM también interaccionan con ELKS/CAST por medio del dominio PDZ (Lu *et al.*, 2005) y con sinaptotagmina-1 y con las proteínas del complejo SNARE a través de los dominios C2B y C2A, respectivamente (Sudhof, 2012).

Estudios en ratones carentes de RIM han mostrado su papel fundamental en la función sináptica. El ratón KO de RIM1 α tiene disminuidos tanto el tamaño del RRP, como la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Kaeser *et al.*, 2008b). Además, el doble KO para RIM1 α y RIM2 α es letal y tiene disminuidos el tamaño del RRP, la frecuencia de las corrientes excitadoras

postsinápticas miniatura (mEPSCs) y la amplitud de las respuestas inducidas por potenciales de acción, así como una falta de sincronización entre la entrada de Ca^{2+} y la exocitosis (Kaeser *et al.*, 2011).

Por otro lado, RIM se ha relacionado con fenómenos de plasticidad a corto y largo plazo dependientes de AMPc (Mittelstaedt *et al.*, 2010). La proteína RIM1 α es importante para la LTP dependiente de AMPc de las fibras musgosas del hipocampo y del cerebelo (Castillo *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005), así como en los procesos de plasticidad en sinapsis inhibitoras (Kaeser *et al.*, 2008a). Además, se ha demostrado que el receptor CB1 presente en el hipocampo inhibe la formación de AMPc evitando la LTP dependiente de RIM, lo que da lugar a una LTD (Chevalleyre *et al.*, 2007).

Munc13

Otra proteína esencial en la preparación de las vesículas para la fusión y la liberación de neurotransmisores (Augustin *et al.*, 1999; Varoqueaux *et al.*, 2002) y que, además, participa en plasticidad dependiente de diacilglicerol (Betz *et al.*, 1998; Rhee *et al.*, 2002) es Munc13 (del inglés, *Mammalian homologue of UNCoordinated phenotype 13 de C. elegans*). Las proteínas Munc13 son codificadas por cuatro genes, Munc13-1-4, que dan lugar a las proteínas Munc13-1, las variantes de procesamiento alternativo bMunc13-2 y ubMunc13-2 (isoformas asociadas al cerebro y ubicua, respectivamente), Munc13-3 y Munc13-4, expresándose esta última solamente en células secretoras periféricas (Brose *et al.*, 1995) (Figura 4).

Respecto a su ubicación en el SNC, la isoforma Munc13-1 se expresa en todo el cerebro, Munc13-2 abunda en bulbo olfatorio, corteza cerebral, e hipocampo, mientras que Munc13-3 se localiza en cerebelo y tronco encefálico (Augustin *et al.*, 1999). A nivel subcelular, las proteínas Munc13 se asocian a membranas por unión del diacilglicerol y translocación a la misma (Betz *et al.*, 1998; Rhee *et al.*, 2002).

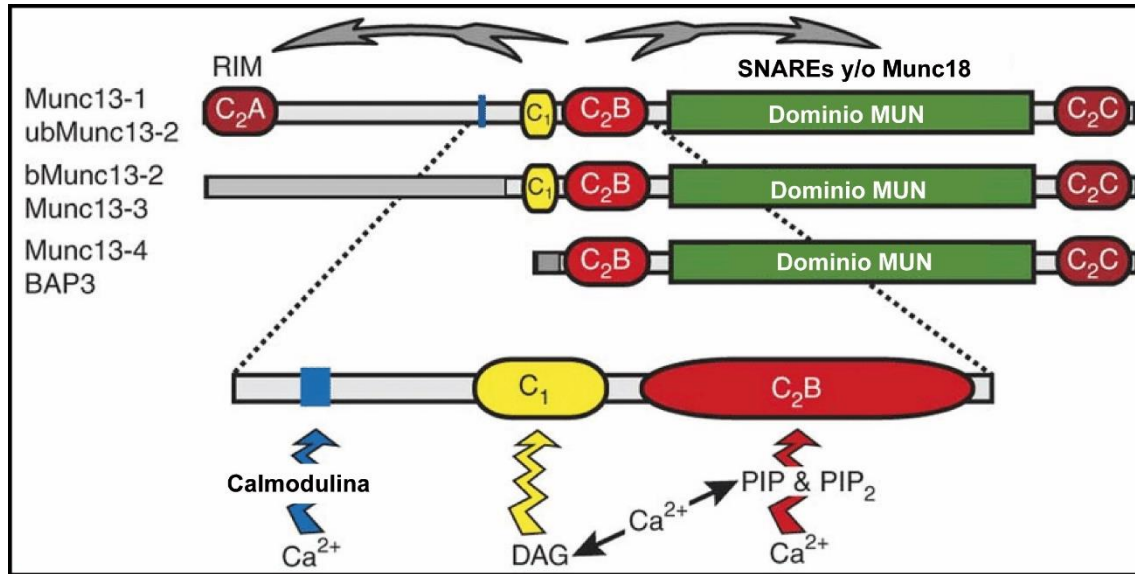


Figura 4. Estructura e isoformas de Munc13. La proteína Munc13 presenta 5 isoformas distintas, siendo Munc13-1, Munc13-2 y Munc13-3 las existentes en el cerebro. Estructuralmente contiene el dominio C2A que permite su homodimerización así como su interacción con RIM, uno de interacción con calmodulina, un dominio C1 con el que une DAG, uno C2B donde une calcio y PIP2 y un dominio MUN que le permite la participación en la formación del complejo SNARE (Shin *et al.*, 2010).

Estructuralmente, las proteínas Munc13 presentan un extremo C-terminal que interacciona con la sintaxina y un extremo N-terminal responsable de su interacción con la proteína RIM1 α (Betz *et al.*, 2001). En el extremo N-terminal se encuentra el dominio C2A, que es responsable de la homodimerización de la proteína. También contiene un dominio de interacción con calmodulina, un dominio C1 de interacción con DAG, un dominio C2B donde une calcio y PIP2 y una región llamada MUN responsable de su actividad en la formación del complejo SNARE (Sudhof, 2012) (Figura 4). Esta región MUN podría favorecer la conformación abierta de la proteína sintaxina-1 (Gerber *et al.*, 2008), permitiendo la exposición del dominio SNARE y el inicio del ensamblaje de dicho complejo (Ma *et al.*, 2011).

La regulación de Munc13 tiene lugar a distintos niveles. Primero, existe un equilibrio entre el homodímero de Munc13 (inactivo) y el heterodímero con

RIM (activo) (Deng *et al.*, 2011a). Además, la unión de calmodulina va a aumentar la actividad de Munc13 lo que contribuye a la preparación de las vesículas para su fusión (Junge *et al.*, 2004). Finalmente, Munc13 presenta un dominio de unión a DAG y la unión de este segundo mensajero va a favorecer la activación de la proteína (Rhee *et al.*, 2002).

Canales de calcio dependientes de voltaje

En la presinapsis los canales de Ca^{2+} se localizan en la zona activa lo que asegura el buen acoplamiento entre la entrada de Ca^{2+} y la liberación de neurotransmisor. Los VDCCs se clasifican como canales de bajo y alto umbral según la magnitud de la despolarización requerida para su apertura. Al primer grupo pertenecen los VDCCs de tipo T y al segundo grupo, los de tipo N, P/Q, R y L (Kisilevsky & Zamponi, 2008; Kamp *et al.*, 2012). De todos ellos, los canales N, P/Q y R son los que controlan la liberación de los neurotransmisores glutamato y GABA en las sinapsis centrales.

Los VDCCs tienen estructura multimérica con una subunidad α_1 , que constituye el poro iónico, y una serie de proteínas auxiliares: subunidad β y subunidades α_2 - δ . La subunidad β es una proteína intracelular que interacciona con la subunidad α_1 . La subunidad α_2 - δ está formada por la región transmembrana δ y por la región extracelular α_2 altamente glucosilada (Kisilevsky & Zamponi, 2008).

-Canales $\text{CaV}2.1$ (α_{1A}) (tipo P/Q). Se localizan en los botones sinápticos y son bloqueados por la toxina ω -agatoxina (McDonough *et al.*, 1997). En la mayoría de sinapsis GABAérgicas, la liberación del GABA depende exclusivamente de estos canales, mientras que en las glutamatérgicas, la entrada de Ca^{2+} para la liberación del neurotransmisor ocurre a través de estos canales y los de tipo N (Kamp *et al.*, 2012). La actividad de los canales P/Q está regulada mediante su interacción con calmodulina (CaM). El efecto de CaM en la actividad del canal depende de los niveles de calcio intracelulares, de tal

manera que, cuando estos niveles se elevan, los canales se inactivan (Mochida, 2018).

-Canales CaV2.2 (α_{1B}) (tipo N). Se localizan a nivel presináptico y son bloqueados por las ω -conotoxinas procedentes de los caracoles marinos del genero *Conus* (Fox, 1995). Al igual que los tipo P/Q, estos canales acoplan la entrada de calcio y la liberación del neurotransmisor mediante su interacción con las proteínas de la maquinaria exocitótica syntaxina 1A y SNAP-25 (Pozzi *et al.*, 2018). La inhibición de los canales de tipo N tiene lugar por la interacción con las subunidades $\beta\gamma$ procedentes de la disociación de las proteínas G heterotriméricas tras la activación de los GPCRs y la syntaxina favorece esta inhibición (Jarvis & Zamponi, 2001). Se ha observado, además, que esta modulación por subunidades $\beta\gamma$ es más fuerte en los canales N que en los canales P/Q (Arnot *et al.*, 2000).

-CaV2.3 (α_{1E}) (tipo R). Participan en la liberación del neurotransmisor en determinadas sinapsis y son sensibles a la toxina SNX-482 procedente de la tarántula *Hysteroocrates gigas*. Al contrario que los canales tipo N y P/Q, que presentan un umbral de activación alto y una cinética de apertura y cierre rápida, estos canales tienen un umbral algo menor y una cinética más lenta (Li *et al.*, 2007).

Los VDCCs de tipo N y P/Q son inhibidos por proteínas Gi/o. Dicha regulación puede ser voltaje-dependiente (VD) o voltaje-independiente (VI). La primera se produce cuando la subunidad $\beta\gamma$ interacciona con la subunidad α_1 del canal favoreciendo la conformación cerrada del mismo. Se la denomina VD porque está favorecida cuando la membrana se encuentra hiperpolarizada, mientras que la despolarización revierte este efecto. Por el contrario, la inhibición VI no depende de la despolarización de la membrana, sino que requiere la puesta en marcha de rutas intracelulares que activen proteínas como la tirosina quinasa (canales N) o la interacción directa de la subunidad α_o con el canal (canales P/Q). También existe una forma de regulación VI que consiste en la internalización de los canales (Kisilevsky & Zamponi, 2008).

1.1.3. Preparación de las vesículas para la fusión

Tras la llegada de un potencial de acción, la fusión de las vesículas se produce mediante la interacción de proteínas que forman el complejo trans-SNARE (del inglés “*SNARE*” *Soluble NSF Attachment Proteins* “*REceptor*”) (Figura 5). Las proteínas SNARE forman parte de una superfamilia de proteínas altamente conservadas. Participan en múltiples vías de tráfico en el interior de la célula. Presentan uno o varios dominios SNARE helicoidales (Fasshauer *et al.*, 1998). La proteína integral de la vesícula sináptica sinaptobrevina o VAMP (del inglés *Vesicle Associated Membrane Protein*) tiene uno, mientras que las proteínas de la membrana presináptica syntaxina-1 y SNAP-25, uno y dos, respectivamente. El complejo SNARE formado entre las proteínas de membrana y vesiculares representa un nexo físico entre ambas membranas lo que posibilita el proceso de fusión. El complejo está compuesto por 4 hélices α , de las cuales dos son aportadas por SNAP-25, una por syntaxina y otra por sinaptobrevina (Poirier *et al.*, 1998).

El proceso de fusión de las VSs se inicia con la preparación de las vesículas para la fusión. Tradicionalmente se ha establecido que esta preparación comienza con el acercamiento y anclaje (del inglés *docking*) de las VSs a la membrana de la zona activa cerca de los VDCCs y de la maquinaria exocitótica seguido de la preparación (del inglés *priming*) de las mismas mediante cambios moleculares de la maquinaria exocitótica para proceder a una fusión rápida en respuesta a la entrada de calcio (Figura 5). No obstante, estudios posteriores parecen indicar que los dos últimos procesos son simultáneos (Imig *et al.*, 2014).

La preparación de las VSs comienza con la formación de un complejo entre sinaptobrevina con syntaxina-1 y SNAP-25. Para que esto tenga lugar, previamente la syntaxina debe pasar de una conformación cerrada a abierta, proceso que está mediado por Munc13 (Sudhof, 2013). Existen, además, otras proteínas que participan en este proceso como son:

-Munc18: se une a syntaxina-1 cuando esta se encuentra en conformación cerrada (Dulubova *et al.*, 1999) y permanece asociada al complejo SNARE después de su formación (Dulubova *et al.*, 2007; Deak *et al.*, 2009) e, incluso, después de la fusión (Zhou *et al.*, 2013b). Además, promueve la formación del poro de fusión (Yu *et al.*, 2013).

-Complejo Munc13-RIM-Rab3: participa en la preparación de las VSs a distintos niveles. Munc13 se mantiene como un homodímero inactivo tras translocarse donde interacciona con DAG (Rhee *et al.*, 2002). Allí, RIM interacciona con Rab3 mediante una unión GTP-dependiente para formar el complejo triple Munc13-RIM-Rab3. Rab3 es, por tanto, una proteína importante en la preparación de las VSs para la exocitosis de tal manera que se ha visto que los ratones carentes de Rab3 manifiestan un déficit en el reclutamiento de vesículas sinápticas durante la estimulación (Leenders *et al.*, 2001). Además, Munc13 favorece el ensamblaje del complejo SNARE mediante el cambio conformacional de la syntaxina-1 de cerrada a abierta (Ma *et al.*, 2013). Por otro lado, RIM regula en gran medida el correcto posicionamiento de los VDCCs (Kaesler *et al.*, 2011; Acuna *et al.*, 2016).

-CAPS, complexinas y sinaptotagminas: se asocian al complejo SNARE desempeñando distintas funciones. Las sinaptotagminas 1 y 2 son sensores de calcio para la exocitosis (Pang *et al.*, 2006a; Pang *et al.*, 2006b). Las proteínas CAPS son esenciales para la preparación de las vesículas sinápticas y el acoplamiento de la liberación a la entrada de Ca^{2+} (Jockusch *et al.*, 2007). Las complexinas son proteínas pequeñas que actúan como cofactores de las sinaptotagminas (Rizo, 2018).

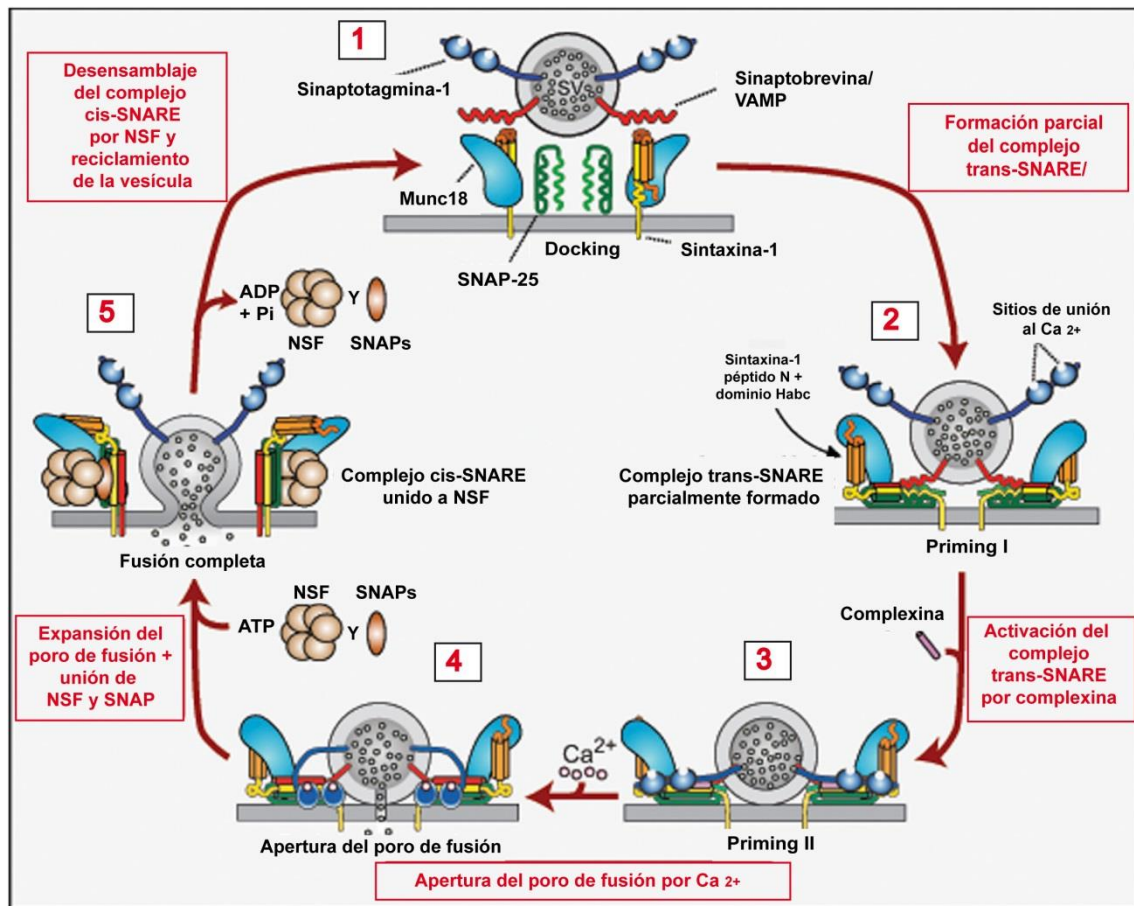


Figura 5. Mecanismos moleculares de la exocitosis. Las VSs en reposo (1) son preparadas para la liberación del neurotransmisor por medio de la interacción (2) entre la sinaptobrevina y la sintaxina-1 y SNAP-25 para iniciar la formación del complejo trans-SNARE que finalizará su ensamblaje (3) tras la unión de las complexinas. (4) La llegada del potencial de acción abrirá los VDCCs y la entrada de Ca^{2+} permitirá la apertura del poro de fusión. (5) La unión de NSF y SNAPs facilitará la expansión del poro de fusión y el cambio conformacional del complejo trans-SNARE a cis-SNARE para su posterior desensamblaje. Basado en (Sudhof, 2013).

La formación del complejo trans-SNARE permite tanto la aproximación de las vesículas a la membrana plasmática, como el inicio de la fusión entre la membrana de las VSs y la membrana plasmática de la zona activa (Hanson *et al.*, 1997). Esta fusión requiere una elevada cantidad de energía, que es proporcionada por el propio ensamblaje del complejo SNARE, ya que este es un proceso altamente exergónico (Jahn & Scheller, 2006; Sudhof & Rizo, 2011). La formación correcta de los complejos SNARE depende del mantenimiento de las conformaciones activas de los dominios SNARE, y de la ausencia de interacciones inespecíficas. Estas funciones dependen de proteínas chaperonas

como CPS (del inglés *Cysteine String Proteins*) y de sinucleínas (Burre *et al.*, 2010), cuya disfunción se ha asociado con la neurodegeneración (Chandra *et al.*, 2005). Finalmente, la expansión del poro de fusión provoca el cambio de conformación del complejo trans-SNARE a cis-SNARE, lo que da lugar al desensamblaje y reciclamiento del mismo.

1.1.4. Mecanismo de la exocitosis

La entrada de Ca^{2+} en el botón sináptico y la activación de sinaptotagmina, que actúa como un sensor de Ca^{2+} para la exocitosis, provoca la fusión de las VSs, la apertura del poro y la liberación del neurotransmisor (Figura 5).

En vertebrados hay 16 isoformas de sinaptotagmina (Sudhof, 2012). Las sinaptotagminas son proteínas transmembrana con dos dominios citoplasmáticos C2 (C2A y C2B) que unen dos y tres iones calcio, respectivamente (Perin *et al.*, 1990; Brose *et al.*, 1992). Ambos dominios se unen a fosfolípidos de forma calcio-dependiente. El papel del calcio en esta interacción parece ser el de disminuir las fuerzas electrostáticas entre los dominios C2 y las membranas aniónicas (McMahon *et al.*, 2010) e incrementar la interacción de sinaptotagmina con el complejo SNARE y los fosfolípidos de la membrana. Las sinaptotagminas requieren como cofactor a las complexinas, que son pequeñas proteínas citosólicas que se unen al complejo SNARE cuando este ha iniciado su formación (Rizo, 2018). Las complexinas funcionan como factor iniciador de los complejos SNARE, promoviendo su ensamblaje e induciendo la fusión vesicular (Xue *et al.*, 2010), aunque también funcionan como freno para la liberación espontánea de neurotransmisor (Kaesler-Woo *et al.*, 2012). La sinaptotagmina estabiliza los complejos trans-SNARE impidiendo la fusión espontánea de las membranas, mientras que la entrada de calcio promueve tanto la incorporación de la sinaptotagmina a la membrana

plasmática, como el desplazamiento de la complexina de la superficie del complejo trans-SNARE, produciendo la exocitosis (Sudhof, 2012; 2014).

La apertura y dilatación del poro de fusión convierte el complejo trans-SNARE inicial en cis-SNARE. Este complejo cis-SNARE es desensamblado con la contribución de NSF (del inglés *N-ethylmaleimide Sensitive Factor*) completando así el ciclo. El desensamblaje del complejo SNARE requiere, no solo a la ATPasa específica NSF, sino también unas proteínas adaptadoras denominadas SNAPs (del inglés *Soluble NSF Attachment Proteins*) (Sollner *et al.*, 1993).

1.2. Receptores de las sinapsis glutamatérgicas: Receptores ionotrópicos de glutamato.

Los receptores ionotrópicos son canales iónicos activados por distintos ligandos como el GABA (receptor GABA A), la acetilcolina (nAChR), la serotonina (receptores 5-HT₃) o el glutamato (iGluRs) entre otros (Vizi & Lendvai, 1999; Yu *et al.*, 2014).

Los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs) median la mayor parte de la neurotransmisión excitadora en el SNC y desempeñan importantes funciones en el aprendizaje y la memoria. Desde un punto de vista estructural son tetrámeros y cada subunidad posee cuatro dominios: dominio N-terminal, dominio extracelular de interacción con el ligando, dominio transmembrana y dominio C-terminal intracelular.

-Receptores N-metil D-aspartato (NMDA): son tetrámeros formados por dos subunidades GluN1 y dos subunidades GluN2A-GluN2D o dos subunidades GluN1, una GluN2 y una GluN3. Estas subunidades constituyen un canal iónico permeable al Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ que se bloquea por el Mg²⁺ extracelular cuando la membrana está en reposo (-70 mV). La activación de este receptor requiere la unión de una molécula de glutamato y otra de glicina, así como la despolarización de la membrana, que permite el desbloqueo del canal

por el ion Mg^{2+} . Estos receptores se localizan fundamentalmente a nivel postsináptico, aunque también aparecen en la presinapsis y en las células gliales (Reiner & Levitz, 2018; Takago & Oshima-Takago, 2018).

-Receptores α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazolil-4-propionato (AMPA): son homo o heterotetrámeros compuestos por la combinación de subunidades GluA1-4. Los receptores AMPA, que incluyen subunidades GluA2, son permeables a Na^+ y K^+ , pero no a Ca^{2+} , mientras que aquellos que carecen de esta subunidad, también son permeables a Ca^{2+} . Estos últimos, además, tienen una cinética de apertura más rápida y mayor conductancia, lo que los convierte en receptores de gran relevancia en la despolarización postsináptica rápida. Los receptores AMPA se localizan fundamentalmente a nivel postsináptico (Takago & Oshima-Takago, 2018), aunque también están presentes en la presinapsis (Pinheiro & Mulle, 2008).

-Receptores kainato: Son tetrámeros formados por subunidades GluK1-5. GluK1-3 forman receptores homo o heteroméricos funcionales, mientras que GluK4-5 precisan combinarse con subunidades GluK1-3 para ser funcionales. Son permeables a Na^+ y K^+ y se localizan a nivel presináptico, donde regulan la liberación de GABA y glutamato, y a nivel postsináptico, donde controlan la excitabilidad neuronal (Takago & Oshima-Takago, 2018).

1.3. Receptores de sinapsis glutamatérgicas. Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son receptores transmembrana que ejercen su acción mediante la activación de proteínas G que, a su vez, activan una proteína efectora, generalmente una enzima o un canal iónico. Esto da lugar a un cambio rápido en la concentración intracelular de segundos mensajeros como AMPc, diacilglicerol (DAG), inositol trisfosfato (IP_3), GMPc, ácido araquidónico, Ca^{2+} , etc.

Desde un punto de vista estructural, los GPCRs tienen unos dominios N- y C-terminal y 7 hélices transmembrana. Originalmente se clasificaron en tres familias: A o tipo rodopsina, B o tipo secretina y C o tipo receptores de glutamato (Kolakowski, 1994), aunque más adelante se incorporó la clase D que incluye receptores como LNB-7TM, Frizzled/Smoothed (F/S) o receptor 1 vomeronasal (V1R) entre otros (Kristiansen, 2004). En la familia A están los receptores β adrenérgicos, así como el receptor de endocannabinoides CB1, mientras que en la C se encuentran los receptores de glutamato (mGluRs) (Kolakowski, 1994).

Los GPCRs activan proteínas G heterotriméricas, constituidas por tres subunidades (α , β , γ), si bien las subunidades β y γ están fuertemente asociadas y actúan como una unidad funcional. Existen 16 tipos de subunidades α , 5 β y 12 γ lo que da lugar a una amplia variedad de combinaciones posibles aunque no todas están favorecidas.

Las proteínas G heterotriméricas a su vez se clasifican en 4 familias: G_s (G_s y G_{olf}), G_i (G_{tr} , G_{tc} , G_g , G_{i1-3} , G_o , y G_z), G_q (G_q , G_{11} , G_{14} , y $G_{15/16}$), y G_{12} (G_{12} y G_{13}). Todas ellas siguen el mismo ciclo de activación/inactivación: la unión del ligando al receptor induce un cambio conformacional que incrementa su afinidad por la proteína G lo que, a su vez, favorece que el GDP unido a la subunidad α se intercambie por GTP. Esto da lugar a una disminución en la afinidad entre la subunidad α y el complejo $\beta\gamma$, lo que provoca una disociación del heterotrímero, quedando la subunidad α por un lado y la unidad $\beta\gamma$ por otro. Las subunidades disociadas son capaces de activar distintas vías de señalización. La inactivación de la proteína G se produce cuando el GTP es hidrolizado a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad α o por la acción de proteínas reguladoras de señalización por proteínas G, RGSs, que inducen el re-ensamblaje del heterotrímero inactivo (Kristiansen, 2004; Yim *et al.*, 2018).

En las sinapsis glutamatérgicas están presentes tanto autoreceptores, que tienen como ligando el glutamato liberado (mGluRs), como heteroreceptores que unen otros ligandos. Todos estos GPCRs modulan la neurotransmisión.

1.3.1. Receptores metabotrópicos de glutamato

Los receptores mGlu modulan la neurotransmisión mediante su acción sobre canales iónicos, sobre la síntesis de segundos mensajeros y sobre la regulación de quinasas encargadas de la fosforilación de proteínas. Los receptores mGlu funcionan como dímeros, ya que cuando se encuentran en forma de monómeros pueden unir glutamato, pero solo en forma de dímeros pueden interaccionar con reguladores alostéricos y activar a proteínas G (El Moustaine *et al.*, 2012).

Los receptores mGlu se caracterizan por presentar un dominio extracelular amino terminal grande, una región rica en cisteínas que actúa como unión con los siete dominios transmembrana, y un dominio intracelular carboxilo terminal. El dominio extracelular alberga el sitio de unión a ligando ECD, (del inglés *ExtraCelular Domain*) y 7 dominios transmembrana que contienen la zona de unión de moduladores alostéricos y de activación de la proteína G. El ECD está constituido por un dominio VFD (del inglés *Venus Flytrap Domain*, por su semejanza a la planta Venus atrapamoscas) bilobulado que contiene el sitio de unión al glutamato (Figura 6). El dominio VFD se une a los segmentos transmembrana a través de un dominio rico en cisteínas (CRD). Cuando el agonista se une al VFD cambia su conformación de abierta a cerrada, generando así la conformación activa (A) con los dos lóbulos globulares del dominio dispuestos en torno al ligando (O'Hara *et al.*, 1993; Muto *et al.*, 2007), mientras que la unión del antagonista favorece el estado de reposo (R). De acuerdo a la dimerización de estos receptores, existen tres estados de activación de los dímeros (Jingami *et al.*, 2003): abierto-abierto (inactivo), cerrado-abierto (parcialmente activo), cerrado-cerrado (activo) (Kniazeff *et al.*, 2004). Los

reguladores alostéricos se unen a nivel de los dominios transmembrana y desempeñan una importante función en la activación específica de distintas cascadas de señalización (Rondard & Pin, 2015).

Los receptores mGlu se han clasificado en tres grupos en función de la homología de la secuencia, vías de señalización que activan y su selectividad por el ligando:

-Receptores de glutamato del grupo I (mGlu1 y mGlu5). Se localizan fundamentalmente en la densidad postsináptica (Houamed *et al.*, 1991; Abe *et al.*, 1992; Mateos *et al.*, 2000; Lopez-Bendito *et al.*, 2002), aunque se expresan también a nivel presináptico (Ovsepian *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2017; Colmers & Bains, 2018).

De forma general, están acoplados a una proteína Gq que hidroliza fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) y genera IP₃, que induce la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico, y DAG que, junto con el calcio, activa a la proteína kinasa C (PKC). Otros efectos atribuidos a los receptores mGlu del grupo I son el incremento de los niveles intracelulares de AMPc, la activación de fosfolipasa D, la inhibición de canales de potasio, la inhibición de los VDCCs del tipo N y P/Q, la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (p38MAPK) y la activación de la proteína quinasa Jun (Hermans & Challiss, 2001; Ribeiro *et al.*, 2010; Willard & Koochekpour, 2013).

A nivel postsináptico, modulan la actividad de los receptores AMPA y NMDA (Fitzjohn *et al.*, 1996; Pisani *et al.*, 2001; Rosenbrock *et al.*, 2010; Stefani & Moghaddam, 2010), participando en la potenciación a largo plazo (LTP) (Aiba *et al.*, 1994; Piccinin *et al.*, 2010) y en la depresión a largo plazo (LTD) (Wang *et al.*, 2009; Suzuki & Okada, 2010; Jones, 2017).

-Receptores de glutamato del grupo II (mGlu2 y mGlu3). Se localizan tanto a nivel post como presináptico. En la presinapsis se expresa mayoritariamente mGlu3 que inhibe la liberación tanto de glutamato, como de otros neurotransmisores como el GABA, la noradrenalina o la dopamina.

Además, mGlu3 aparece tanto en neuronas como en células gliales mientras que mGlu2 es exclusivamente neuronal (Ohishi *et al.*, 1998; Tamaru *et al.*, 2001).

Los receptores mGlu del grupo II se acoplan a proteínas Gi/o e inhiben tanto la adenilato ciclasa, como los VDCCs, mientras que activan canales GIRKs (del inglés *G protein-coupled Inwardly-Rectifying potassium (K) channels*). Estos receptores también activan las vías PI3K y MAP quinasas (MAPK) (Muguruza *et al.*, 2016).

-Receptores de glutamato del grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 y mGlu8). Se localizan fundamentalmente a nivel presináptico en sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas modulando la liberación de estos neurotransmisores. mGlu6 se expresa exclusivamente en retina, mientras que el resto de receptores se distribuyen por las distintas áreas del sistema nervioso central. Las acciones inhibitoras de estos receptores están mediadas por la activación de proteínas Gi/o que a su vez reducen la actividad de la adenilato ciclasa y de los VDCCs o bien activan canales GIRKs (Flor & Acher, 2012).

1.3.1.1. Receptores mGlu7.

Si bien se estableció que los receptores mGlu7 actúan como homodímeros (Figura 6), se ha observado que algunas de sus acciones las realizan formando heterodímeros con otros receptores metabotrópicos de glutamato, principalmente mGlu8 (Kammermeier, 2015).

Existen cinco isoformas de mGlu7 (a-e), de las que mGlu7a es más abundante que mGlu7b, mientras que mGlu7c y mGlu7d se encuentran en tejidos no neurales. La localización de estos receptores es esencialmente presináptica (Figura 6), aunque en algunos tipos de sinapsis se localizan a nivel postsináptico como en el globo pálido y en el estriado (Palazzo *et al.*, 2016). En comparación con los demás receptores del grupo III, mGlu7 es el que presenta menor afinidad por el glutamato, por lo que se ha propuesto que su función sea

actuar de “freno” ante niveles elevados de actividad de las sinapsis glutamatérgicas (Niswender & Conn, 2010).

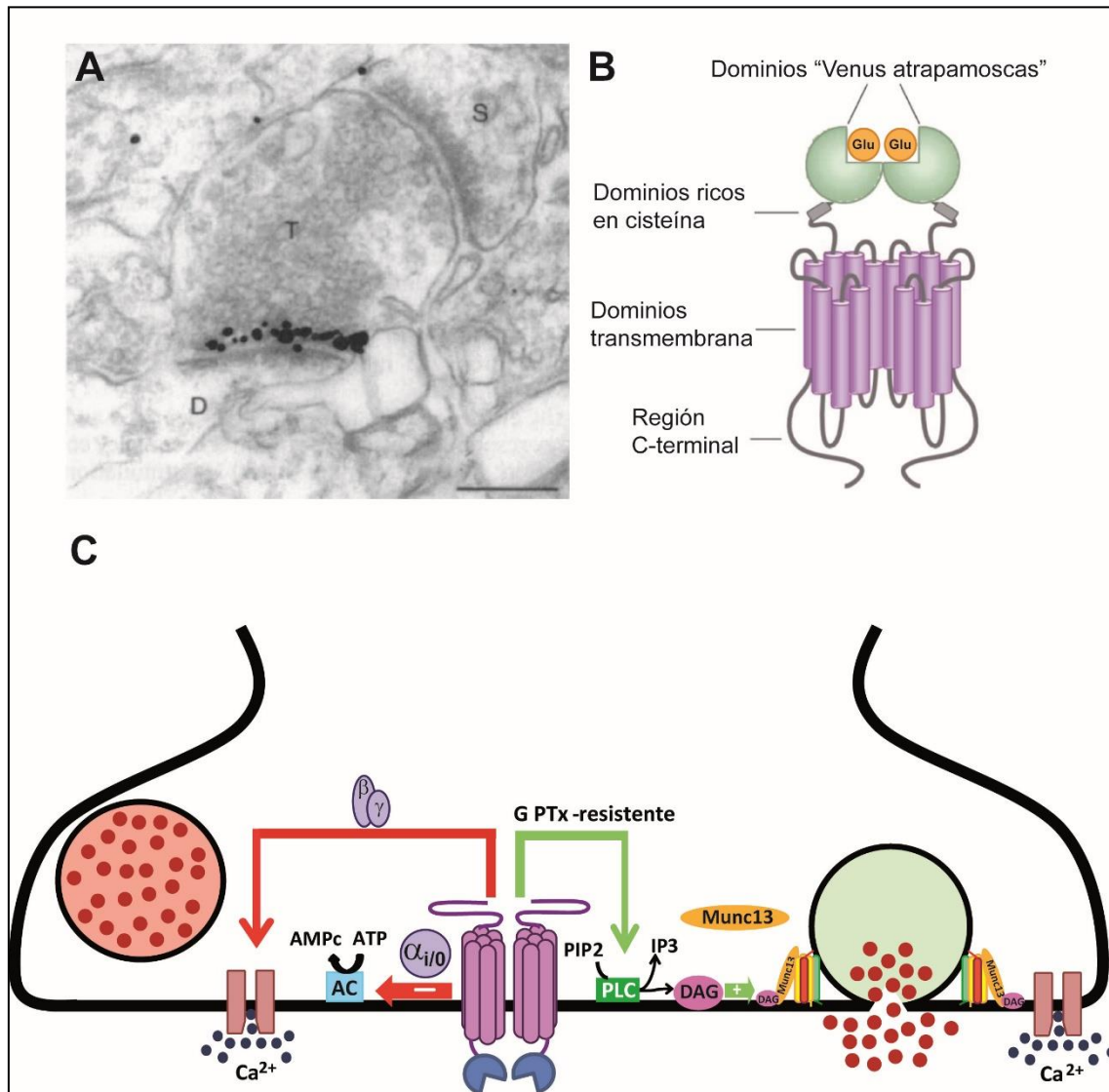


Figura 6. Receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu7). (A) Localización de mGlu7 en la sinapsis (Shigemoto *et al.*, 1996). (B) Estructura de los mGluRs basada en (Niswender & Conn, 2010). C, Modulación dual de la liberación de neurotransmisor por mGlu7. La acción inhibitoria emplea la unión a proteínas Gi/o, mientras que la potenciación requiere la interacción con proteínas G resistentes a toxina pertussis (PTx).

La expresión de los receptores mGlu7 está influenciada por la neurona postsináptica. Así, los terminales presinápticos del axón de una neurona piramidal que establecen sinapsis con interneuronas que expresan el receptor

mGlu1 presentan una concentración más de 10 veces mayor del receptor mGlu7 que los botones sinápticos del mismo axón que contactan con otras neuronas piramidales u otro tipo de interneuronas (Shigemoto *et al.*, 1997). Recientemente se ha demostrado que la localización presináptica de los receptores mGlu7 depende del reclutamiento por la proteína postsináptica Efn1 (Tomiooka *et al.*, 2014). La etapa de desarrollo es otro factor que influye en la expresión de mGlu7. Así, en las etapas iniciales de desarrollo del hipocampo la transmisión sináptica es controlada por los receptores mGlu4/8, que tienen alta afinidad por glutamato, mientras que, en etapas más avanzadas, sólo se expresan los receptores mGlu7 de baja afinidad (Ayala *et al.*, 2008). Asimismo, en los terminales cerebrocorticales de corteza purificados de ratas jóvenes se expresan los receptores mGlu4 y mGlu7, mientras que, en los obtenidos de ratas adultas, sólo se expresan los receptores mGlu7 (Millan *et al.*, 2002b; Martin *et al.*, 2010). Esto explicaría la aparición del fenotipo epiléptico de los ratones carentes de mGlu7 sólo a partir de las 10 semanas de edad (Sansig *et al.*, 2001).

Por otro lado, se ha observado que el receptor mGlu7 se coexpresa con distintos subtipos de VDCCs en función del área cerebral. Así en la corteza el receptor se expresa solo en terminales presinápticos con VDCCs de tipo N (Millan *et al.*, 2002b). Además, en el ratón KO para los canales de tipo N, en el que todos los terminales presinápticos presentan exclusivamente canales tipo P/Q, se pierde la acción inhibitoria del receptor mGlu7 (Martin *et al.*, 2008). Sin embargo, en el hipocampo, el receptor se expresa en terminales con canales de tipo P/Q (Martin *et al.*, 2008).

De manera general, los receptores mGlu del grupo III interaccionan con numerosas proteínas y esto afecta a su función. El extremo C terminal de mGlu7 interacciona con la proteína PICK1 (del inglés *Protein Interacting With C Kinase 1*), lo que resulta necesario para la correcta localización y función del receptor en la zona activa (Boudin *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2008). La interacción con calcio/calmodulina (Ca/CaM) también regula la función del receptor mGlu7 ya que Ca/CaM y las subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G triméricas ($G\beta\gamma$)

interaccionan con la misma región proximal del extremo C terminal. Así, en estado de reposo, los receptores mGlu7 tienen la subunidad $G\beta\gamma$ unida, mientras que tras el aumento de Ca^{2+} en la zona activa y la liberación de glutamato, la interacción con Ca/CaM desplaza la subunidad $G\beta\gamma$ y permite la señalización e inhibición de la actividad de los canales de Ca^{2+} (El Far & Betz, 2002; Bertaso *et al.*, 2006). De acuerdo con este modelo, los inhibidores de CaM suprimen la inhibición de la liberación de glutamato por el receptor mGlu7 (O'Connor *et al.*, 1999; Millan *et al.*, 2002a; Martin *et al.*, 2007). Además, el receptor mGlu7 también participa en la formación de complejos proteicos con las proteínas de la maquinaria exocitótica Munc13-1 (Martin *et al.*, 2010) y RIM1 α (Pelkey *et al.*, 2008). Por último, la fosforilación por PKC de la serina 862 del sitio de unión de Ca/CaM inhibe la unión de Ca/CaM (Airas *et al.*, 2001) y la función del receptor (Macek *et al.*, 1998; Millan *et al.*, 2002a).

Hasta la fecha no se dispone de un agonista selectivo del receptor mGlu7. El agonista ortostérico ácido L-(+)-2-amino-4-fosfanobutírico (L-AP4), igual que el glutamato endógeno, activa todos los receptores mGlu del grupo III (mGlu4/6/7/8) (Schoepp *et al.*, 1999). A pesar de esta limitación, se dispone de diversos ligandos alostéricos, como el modulador positivo AMN082 o los moduladores negativos MMPIP y ADX71743. AMN082 activa proteínas G en líneas celulares (Suzuki *et al.*, 2007) e induce la internalización del receptor (Pelkey *et al.*, 2008), pero no activa las vías de señalización dependientes del receptor mGlu7 en algunas sinapsis (Ayala *et al.*, 2008). Además, AMN082 inhibe el transportador de serotonina, dopamina y noradrenalina (Sukoff Rizzo *et al.*, 2011). No obstante, hay que señalar que el estudio de las funciones del receptor mGlu7 está facilitado por la expresión selectiva de este receptor en preparaciones como sinaptosomas cerebrocorticales (Millan *et al.*, 2002b; Martin *et al.*, 2010) o rodajas de hipocampo de ratones adultos (Martin *et al.*, 2018), así como por la disponibilidad de ratones carentes de mGlu7 o la existencia de moduladores alostéricos negativos selectivos para este receptor (Fisher *et al.*, 2018).

Modulación de la liberación de glutamato y de la transmisión sináptica por receptores mGlu7.

La activación de los receptores metabotrópicos de tipo III por L-AP4 reduce la neurotransmisión excitadora en numerosas regiones cerebrales (Baskys & Malenka, 1991; Takahashi *et al.*, 1996; Capogna, 2004). Esta inhibición tiene un origen presináptico, ya que incrementa la PPR (del inglés *Paired Pulse Ratio*) y reduce la frecuencia, pero no la amplitud, de la liberación espontánea o mEPSC (del inglés *miniature Excitatory Postsynaptic Current*). Además, estos receptores disminuyen la liberación de glutamato en preparaciones de terminales sinápticos purificados o sinaptosomas (Millan *et al.*, 2002b; a; Millan *et al.*, 2003a; Martin *et al.*, 2007). Estos receptores también se localizan en terminales GABAérgicos inhibiendo la transmisión sináptica inhibitoria (Salt & Eaton, 1995; Klar *et al.*, 2015).

El principal mecanismo por el que los receptores mGlu del grupo III, y en particular mGlu7, inhiben la liberación de glutamato es por la inhibición de los VDCCs (Figura 6). Esta acción afecta a canales de tipo P/Q y de tipo N, implica a proteínas Gi/o sensibles a PTx, y se efectúa por un mecanismo limitado a la membrana en el que participan las subunidades $\beta\gamma$ (Herlitze *et al.*, 1996). Este mecanismo de inhibición no requiere la activación de PKC ni PKA pero si la acción de Ca/CaM (Millan *et al.*, 2002a; Martin *et al.*, 2007). Es más, la activación de estas quinasas revierte la inhibición por fosforilación del receptor.

Los receptores metabotrópicos del grupo III también inhiben la adenilato ciclasa (AC) (Figura 6) y esta acción reduce el efecto potenciador mediado por AMPc en distintos sistemas de expresión (Okamoto *et al.*, 1994), en rodajas de hipocampo (Schoepp & Johnson, 1993) y en sinaptosomas (Herrero & Sanchez-Prieto, 1996; Millan *et al.*, 2002a; Martin *et al.*, 2007), aunque la inhibición de la AC no es efectiva si esta no se ha estimulado previamente (Herrero & Sanchez-Prieto, 1996; Schoppa & Westbrook, 1997; Millan *et al.*, 2002a; Martin *et al.*, 2007). Así, el receptor mGlu7 inhibe la potenciación dependiente de la activación de los receptores β adrenérgicos mediada por la vía AC/PKA en

terminales presinápticos glutamatérgicos (Herrero & Sanchez-Prieto, 1996; Millan *et al.*, 2002a).

Asimismo, se ha observado que las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas Gi/o activan canales GIRKs, favoreciendo la salida de potasio y la hiperpolarización de la célula. Este mecanismo de señalización también es activado por receptores mGlu7 en sistemas de expresión génica (Niswender *et al.*, 2008).

Si bien la acción primaria del receptor mGlu7 es la inhibición de la liberación de glutamato, hay evidencias de que los receptores mGlu del grupo III también pueden potenciar la liberación. En la corteza entorrinal los receptores mGlu4 y mGlu8 aumentan la frecuencia de la liberación espontánea (Evans *et al.*, 2000; Woodhall *et al.*, 2007). En el cáliz de Held se ha observado una doble modulación por receptores mGlu del grupo III que, además de inhibir la liberación de neurotransmisor, aumentan la cantidad de vesículas sinápticas dispuestas para la liberación o RRP (Billups *et al.*, 2005). Asimismo, en las sinapsis de las fibras musgosas de hipocampo con interneuronas, la exposición prolongada al agonista lleva a la pérdida de la acción inhibitoria del receptor mGlu7 (Pelkey *et al.*, 2005).

En sinaptosomas de corteza cerebral se ha observado que una estimulación prolongada del receptor con el agonista L-AP4 conduce a una potenciación de la liberación del neurotransmisor mediante un mecanismo independiente de proteínas G sensibles a toxina pertussis (Martin *et al.*, 2010) y que esta potenciación es consecuencia de una nueva señalización que compensa la acción inhibitoria del receptor. En esta preparación, la activación prolongada del receptor mGlu7 activa la fosfolipasa C (PLC) promoviendo la hidrólisis de fosfatidilinositol PIP_2 y generando IP_3 y DAG. La potenciación de la liberación parece ser independiente de la actividad de PKC, pero dependiente de otras proteínas que unen DAG como la proteína Munc13-1, cuya translocación a la membrana plasmática es promovida por la activación del receptor (Martin *et al.*, 2010).

Por lo tanto, es posible que el receptor mGlu7 pueda participar en mecanismos de potenciación de la liberación de glutamato dependientes de la maquinaria excitotóxica (Figura 6). En este sentido hay que señalar que la proteína Munc13-1, una vez translocada a la membrana, forma un complejo con la proteína de la zona activa RIM (Dulubova *et al.*, 2005) y que este heterodímero activo (Deng *et al.*, 2011a) habilita a la proteína Munc13-1 para iniciar la formación del complejo SNARE y aproximar las vesículas sinápticas a la membrana plasmática, aumentando así el número de vesículas sinápticas dispuestas para la liberación (Betz *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2011a; Sudhof, 2012; Das *et al.*, 2018). La activación de Munc13 por PLC participa en procesos de potenciación a corto plazo (STP, del inglés *Short Term Potentiation*) (Rhee *et al.*, 2002; Rosenmund *et al.*, 2002) mientras que el receptor mGlu7 promueve procesos de potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *Long Term Potentiation*) dependientes de AMPc y de la proteína RIM (Pelkey & McBain, 2008).

Este control bidireccional por receptores mGlu7 se observa también en la transmisión sináptica entre las fibras colaterales de Schaffer y las células piramidales CA1 del hipocampo (Martin *et al.*, 2018). Esta modulación es dinámica, ya que primero hay una reducción y luego un aumento de la amplitud de los EPSCs que, seguramente, refleja la mayor complejidad del mecanismo de potenciación. La potenciación, pero no la inhibición, así como la aproximación de las vesículas sinápticas a la membrana se pierde en los ratones carentes de las proteínas Munc13-2 o RIM1 α . Además, la activación endógena del receptor también modula la transmisión bidireccionalmente, pero en estas condiciones la potenciación aparece rápidamente y anula cualquier inhibición, de manera que la potenciación prevalece a menos que esta se suprima con un inhibidor de PLC (Martin *et al.*, 2018).

Los receptores mGlu7 participan tanto en la depresión a largo plazo (LTD) como en la potenciación a largo plazo (LTP) ambas implicadas en el aprendizaje y la memoria (Takeuchi *et al.*, 2014). En las sinapsis de las fibras musgosas de hipocampo con interneuronas, la estimulación de alta frecuencia

(HFS, del inglés *High Frequency Stimulation*) activa el receptor mGlu7 e induce LTD. Sin embargo, esta LTD desaparece por la aplicación prolongada del agonista, como consecuencia de la internalización del receptor (Pelkey *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado que la LTD en interneuronas requiere la acción combinada del receptor mGlu7 a nivel presináptico con la entrada de Ca^{2+} por receptores AMPA a nivel postsináptico (Laezza *et al.*, 1999). Por otra parte, el ratón que carece del receptor mGlu7 muestra una reducción en la facilitación a corto plazo (STP) y en la fase inicial de la potenciación a largo plazo (LTP) (Bushell *et al.*, 2002). Estudios recientes en la región CA1 del hipocampo han mostrado que la activación el receptor mGlu7 en sinapsis GABAérgicas facilita la LTP de la transmisión glutamatérgica por desinhibición (Klar *et al.*, 2015).

1.3.2. Heteroreceptores. Sistema endocannabinoide. Receptores CB1.

Además de los mGluRs, existen otros GPCRs presentes en las sinapsis glutamatérgicas, activados por neuromoduladores o neurotransmisores distintos a glutamato generados en la misma sinapsis o en sinapsis vecinas, que son capaces de modular la liberación del glutamato.

El sistema endocannabinoide está compuesto por los GPCRs CB1 y CB2, los cannabinoides endógenos 2-araquidoinoilglicerol (2-AG) y anandamida, y los enzimas implicados en su síntesis y degradación. El sistema endocannabinoide desempeña un papel fundamental en múltiples procesos como la memoria, el control del estado de ánimo, los mecanismos de recompensa, la adicción a drogas y distintos procesos metabólicos (Ezzili *et al.*, 2010).

La síntesis de los endocannabinoides en SNC tiene lugar a nivel postsináptico tras la activación de la neurona postsináptica y la entrada de calcio. En la síntesis del 2-AG, que es el endocannabinoide más abundante en el SNC (Reisenberg *et al.*, 2012), parecen estar implicadas dos enzimas, la

fosfolipasa β (PLC β) (Maejima *et al.*, 2005), que genera diacilglicerol, y la diacilglicerol lipasa α (DGL α) (Yoshida *et al.*, 2006), que hidroliza el DAG generando 2-AG. Esta síntesis se induce en respuesta a un aumento transitorio de la concentración de calcio, presumiblemente tras la despolarización y activación de los canales de calcio voltaje dependientes, o en respuesta a la estimulación de receptores metabotrópicos de glutamato de tipo I, o de forma sinérgica en respuesta a la coincidencia de ambos estímulos (Brenowitz & Regehr, 2005). Se cree que la enzima PLC β es la responsable de detectar la coincidencia entre la concentración postsináptica de calcio y la señalización por el GPCR (Hashimotodani *et al.*, 2005; Maejima *et al.*, 2005). El 2-AG es degradado por múltiples enzimas, siendo la más predominante la monoacilglicerol lipasa (MAGL) que lo transformará en ácido araquidónico (AA) y glicerol. Otros enzimas que también pueden degradar el 2-AG son la proteína 12 con dominio hidrolasa α , β , la ciclooxygenasa o el citocromo p450 entre otros (Baggelaar *et al.*, 2018).

Como ya se ha mencionado el DAG se metaboliza a nivel postsináptico por las diacilglicerol lipasas (DAGL α y β) (Reisenberg *et al.*, 2012). En la corteza prefrontal el receptor mGlu5 facilita la síntesis de endocannabinoides por asociación con DAGL α (Jung *et al.*, 2007; Maccarrone *et al.*, 2010). Así, en esta región cerebral mGlu5 inicia una LTD independiente de la síntesis de proteínas y dependiente de la activación del sistema endocannabinoide (Robbe *et al.*, 2002). Esta disponibilidad de cannabinoides está reducida en ratones *Fmr1* KO ya que la ausencia de FMRP conlleva a una deslocalización de la DAGL α lo que se traduce en una pérdida de la LTD de las sinapsis excitadoras de la corteza prefrontal (Darnell *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2012).

El sistema endocannabinoide comprende dos tipos de receptores principales, el CB1 y el CB2, si bien existen otros tipos de receptores como GPR18 y 55, los receptores huérfanos GPR3, 6 y 12 o los receptores sensibles a alquilindol (Morales & Reggio, 2017).

Originalmente se pensaba que el receptor CB1 era el único presente en el SNC mientras que CB2 estaba restringido al sistema inmune, sin embargo, más adelante se demostró también la presencia de CB2 en cerebro (Nunez *et al.*, 2004; Ashton *et al.*, 2006; Ashton *et al.*, 2007; Schley *et al.*, 2009). No obstante, la expresión de los receptores CB2 es menor y parece aumentar fundamentalmente en condiciones patológicas (Chen *et al.*, 2017; Kho *et al.*, 2017).

Receptores CB1.

El receptor CB1 es el receptor metabotrópico más abundante en el cerebro. Al igual que los demás GPCRs, está formado por un dominio N-terminal, 7 dominios transmembrana y un dominio C-terminal intracelular, pero, en estos receptores, la interacción con sus ligandos tiene lugar a través de los dominios transmembrana 3 y 6 dada la naturaleza hidrofóbica de estos (Kano *et al.*, 2009). Los receptores cannabinoides son funcionales tanto en forma de homodímero (Wager-Miller *et al.*, 2002) como de heterodímero en combinación con otros receptores como el receptor de dopamina 2 (D2) (Bagher *et al.*, 2017), orexina OX1R (Ibrahim & Abdel-Rahman, 2015), serotonina 5HT2A (Vinals *et al.*, 2015) y el receptor mu opioide (Hojo *et al.*, 2008) entre otros (Morales & Reggio, 2017).

El receptor CB1 se localiza a nivel presináptico en la región perisináptica (Figura 7) y es más abundante en neuronas GABAérgicas que en glutamatérgicas. Las áreas cerebrales que muestran una expresión alta del receptor son hipocampo, cerebelo, corteza, ganglios basales, amígdala y estriado, mientras que su expresión es escasa en tronco encefálico, diencefalo y médula espinal (Gorzkiwicz & Szmraj, 2018). Los receptores CB1 están implicados en la regulación de un gran número de procesos fisiológicos y patológicos incluido el desarrollo cerebral, aprendizaje y memoria, comportamiento motor, regulación del apetito, temperatura corporal,

percepción del dolor e inflamación así como trastornos psiquiátricos, neurológicos y de neurodesarrollo (Busquets Garcia *et al.*, 2016).

Generalmente el receptor se acopla a una proteína Gi/o para inhibir la adenilato ciclasa y los VDCCs (Figura 7) y para activar a los GIRKs, aunque puede acoplarse también a una proteína Gs y activar a la adenilato ciclasa en condiciones de bloqueo de las proteínas Gi/o con toxina pertussis o cuando se estimula simultáneamente con el receptor D2 (Glass & Felder, 1997; Busch *et al.*, 2004). No obstante, el efecto del receptor CB1 sobre la AC parece depender también de la isoforma de esta última (Patel *et al.*, 2001). CB1 inhibe las AC-I, AC-III, AC-V, AC-VI y AC-VIII mientras que estimula la síntesis de AMPc cuando se expresa con las AC-II, AC-IV y AC-VII (Rhee *et al.*, 1998). Asimismo, el receptor CB1 activa la ruta de las MAP quinasas mediante la activación de ERK1/2 aunque esta acción parece ser dependiente del tipo celular (Turu & Hunyady, 2010).

La activación del receptor CB1 inhibe la liberación de neurotransmisor (Shen *et al.*, 1996; Godino *et al.*, 2005) por medio de dos mecanismos dependientes de proteínas G (Pitler & Alger, 1994) (Figura 7): por un lado, la inhibición de los VDCCs por la acción del dímero $\beta\gamma$ (Kreitzer & Regehr, 2001; Brown *et al.*, 2004) y, por otro, la activación de los canales rectificadores de potasio dependientes de proteínas G (GIRKs), concretamente GIRK1/4 (Guo & Ikeda, 2004). Ambas acciones disminuyen la excitabilidad de la neurona presináptica y, por tanto, la liberación de neurotransmisor (Chevalleyre *et al.*, 2006). Además, la activación de la subunidad α_i inhibe la enzima adenilato ciclasa causando una disminución de los niveles de AMPc (Childers & Deadwyler, 1996; Godino *et al.*, 2005). Clásicamente se ha considerado que la disminución de los niveles de AMPc afectaría exclusivamente a la vía inducida por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) (Heifets & Castillo, 2009), aunque otras proteínas reguladas por AMPc podrían verse igualmente afectadas (Yang *et al.*, 2012). Se ha considerado que los cambios en la actividad de los canales de Ca^{2+} y K^{+} inducidos por los cannabinoides podrían estar

relacionados con los fenómenos de plasticidad a corto plazo, mientras que la disminución de los niveles de AMPc y los cambios asociados a la actividad de la maquinaria exocitótica se asocian a los mecanismos de depresión de la actividad sináptica a largo plazo (Schoch *et al.*, 2002; Castillo, 2012).

La acción inhibidora de los endocannabinoides se describió primero en las sinapsis GABAérgicas. Al despolarizar la célula postsináptica, se observó una depresión transitoria de la transmisión sináptica debida a una acción retrógrada del cannabinoide que, generado en la postsinapsis, difunde a la presinapsis activando receptores CB1 que, a su vez, inhiben la entrada de Ca^{2+} y la liberación del neurotransmisor GABA. Este fenómeno se denominó DSI (del inglés *Depolarization induced Supression of Inhibition*) (Llano *et al.*, 1991; Pitler & Alger, 1992). En el caso de las sinapsis excitadoras, la activación del receptor CB1 también induce una inhibición en la liberación de glutamato dando lugar al fenómeno denominado DSE (del inglés *Depolarization induced Supression of Excitation*) (Kreitzer & Regehr, 2001). Tanto la DSI como la DSE constituyen dos formas de eCB-STD (del inglés *endocannabinoids Short Term Depression*). El hecho de que los endocannabinoides liberados desde la postsinapsis activen receptores CB1 presinápticos fue demostrado mediante el bloqueo de la DSE con antagonistas de CB1 (Kreitzer & Regehr, 2001; Maejima *et al.*, 2001) y en ratones carentes del receptor (Safo & Regehr, 2005).

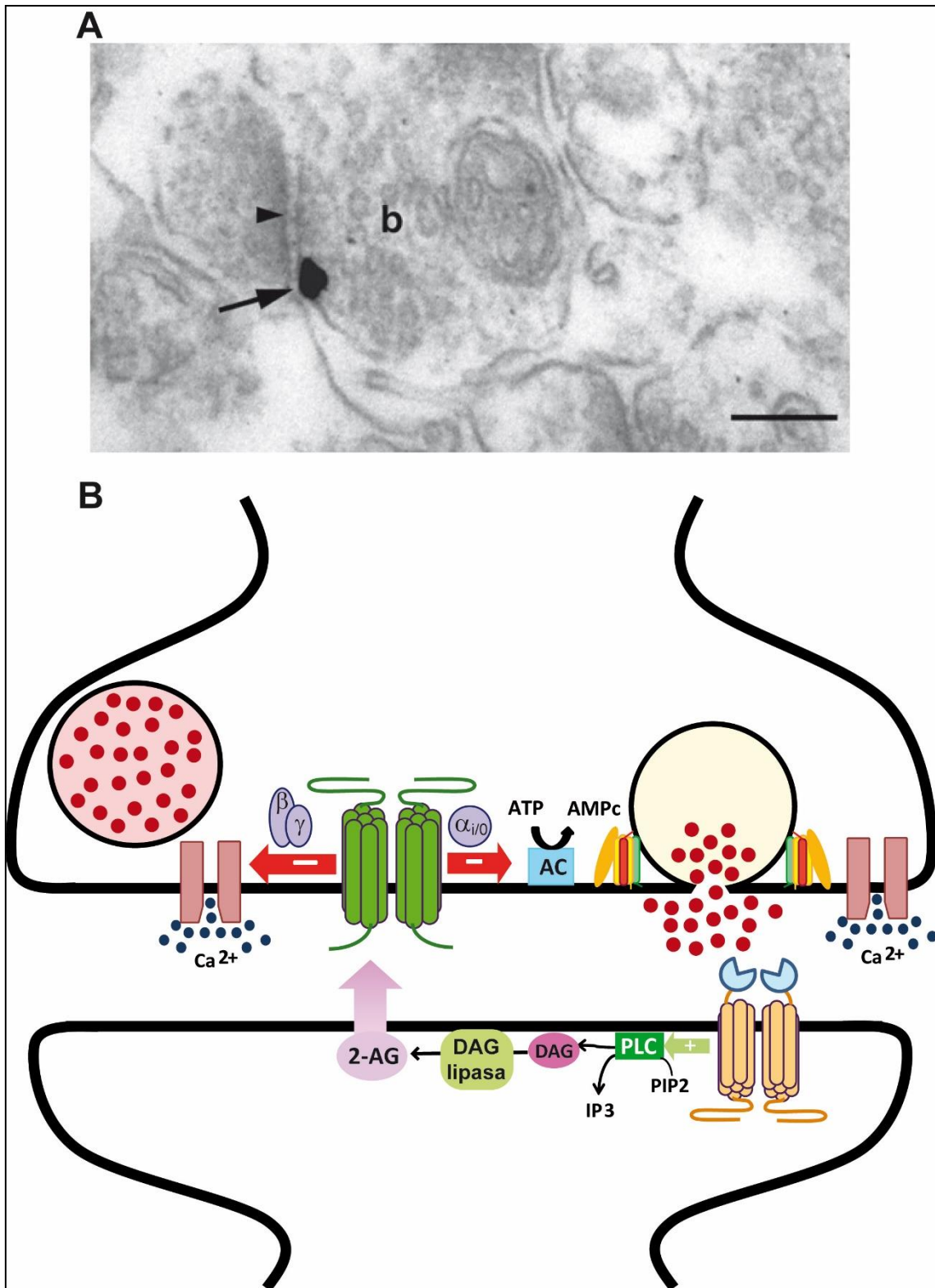


Figura 7. Localización y rutas señalización del receptor CB1. (A) El receptor CB1 se localiza en la zona presináptica en las sinapsis glutamatérgicas (Katona *et al.*, 2006). (B) La acción de los endocannabinoides tiene lugar de manera retrógrada tras estimularse la síntesis de los mismos por la activación de los mGluRs acoplados a una proteína Gq. Estos endocannabinoides difundirán hacia la presinapsis activando al receptor CB1 que, a su vez, inhibirá la liberación del glutamato mediante los mecanismos indicados.

Poco después de ser descritos los fenómenos de DSE y DSI, se demostró que los cannabinoides también inhibían la liberación de neurotransmisor de manera prolongada (LTD) tanto en neuronas excitadoras (Gerdeman *et al.*, 2002; Robbe *et al.*, 2002), como inhibidoras (Marsicano *et al.*, 2002; Chevalleyre & Castillo, 2003). Esta depresión a largo plazo se ha estudiado en diferentes regiones cerebrales como el estriado dorsal, la amígdala, el hipocampo, el núcleo accumbens, el cerebelo, los colículos superiores y el área tegmental ventral. La inducción de la depresión a largo plazo por los cannabinoides está relacionada con la inhibición de la adenilato ciclasa y la disminución de los niveles de AMPc en la neurona presináptica (Chevalleyre & Castillo, 2003; Chevalleyre *et al.*, 2006; Heifets & Castillo, 2009). Además, requiere tiempos de activación del receptor CB1 mucho mayores que la inducción de los fenómenos de DSI y DSE (Chevalleyre & Castillo, 2003; Ronesi *et al.*, 2004).

Cabe destacar que, en algunas sinapsis, la LTD dependiente del sistema cannabinoide implica sólo a la fase de inducción y no a la fase de mantenimiento de la misma (Safo & Regehr, 2005). Se ha propuesto que el mantenimiento de la LTD en algunas sinapsis podría estar relacionado con la activación de receptores NMDA presinápticos (Nevian & Sakmann, 2006; Rodriguez-Moreno & Paulsen, 2008) y con la entrada de calcio en la neurona presináptica que podría activar a la fosfatasa calcineurina, que es requerida para el mantenimiento de la LTD en algunas interneuronas (Heifets *et al.*, 2008). La expresión postsináptica de este fenómeno es una de las peculiaridades que presenta la LTD mediada por cannabinoides en las sinapsis entre fibras paralelas y células de Purkinje en el cerebelo. La mayoría de autores también coinciden en que la inducción de la LTD depende de la liberación de endocannabinoides y tiene una expresión presináptica, mientras que el mantenimiento de la misma es independiente de cannabinoides y se expresa de forma postsináptica (Safo *et al.*, 2006). La mayoría de las evidencias indican que la inhibición de la vía AMPc/PKA dependiente de la activación del receptor CB1 es crucial para la inducción de formas presinápticas de LTD tanto en sinapsis inhibidoras como excitadoras.

La exposición prolongada a los agonistas cannabinoides en cultivos de células granulares de cerebelo silencia presinápticamente una subpoblación de botones sinápticos que previamente eran activos (Ramirez-Franco *et al.*, 2014). Este fenómeno se relaciona con la disminución en los niveles de AMPc y de las actividades de Epac y de PLC, de manera que ESI05, un inhibidor selectivo de Epac2, y U-73122, un inhibidor específico de la PLC, incrementan el número de botones sinápticos silentes, mientras que la activación de Epac previene el silenciamiento inducido por los agonistas cannabinoides. Las células carentes de RIM1 α (RIM1 α KO) tienen más botones silentes de manera constitutiva. Este silenciamiento presináptico inducido por los cannabinoides parece depender de la reducción de la actividad de la vía de señalización AMPc/Epac/PLC que afecta a la maquinaria exocitótica retirando vesículas sináptica de la membrana plasmática en la zona activa (Alonso *et al.*, 2017).

Los agonistas de los receptores de cannabinoides tienen uso terapéutico en algunas patologías. La mezcla de tetrahidrocannabinol (THC) con cannabidiol se utiliza para el dolor neuropático en la esclerosis múltiple y derivados sintéticos del THC, como antieméticos para pacientes con cáncer y estimulantes del apetito en individuos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. No obstante, estos fármacos solo están aprobados en algunos países. Respecto a los antagonistas, el rimonabant (antagonista selectivo del receptor CB1) se empleó para el tratamiento de la obesidad aunque tuvo que ser retirado debido a los efectos secundarios de naturaleza psiquiátrica que provocaba (Chanda *et al.*, 2019).

1.3.3. Heteroreceptores. Sistema noradrenérgico. Receptores β adrenérgicos.

Los receptores β adrenérgicos (β ARs) son un tipo de GPCRs, pertenecientes a la familia de los receptores adrenérgicos, que actúan como heteroreceptores en las sinapsis glutamatérgicas. Estos receptores, en el SNC,

son activados por noradrenalina y están acoplados a la estimulación de la adenilato ciclasa (AC) por medio de proteínas Gs, generando el segundo mensajero AMPc. Los β ARs ejercen importantes y variadas funciones biológicas en diferentes tejidos, participando también en mecanismos de plasticidad sináptica en el cerebro.

En el SNC las neuronas noradrenérgicas sitúan sus somas en el locus coeruleus desde donde proyectan a las distintas áreas del cerebro, incluyendo amígdala, tálamo, hipocampo, cerebelo y corteza (Sara, 2009). Dichas neuronas liberan noradrenalina que activa distintos tipos de receptores: α_1 (A, B y D), α_2 (A, B y C), β_1 , β_2 y β_3 . Los receptores α_1 se acoplan a proteínas Gq/11 activando PLC y la síntesis de IP₃ y DAG. Los receptores α_2 ejercen sus efectos mediante una proteína Gi/o, que inhibe la adenilato ciclasa y la actividad de los VDCCs y activa los GIRKs y las MAP quinasas. Los receptores β_1 se acoplan a una proteína Gs que activa a la adenilato ciclasa favoreciendo la síntesis de AMPc (Figura 8). Por su parte, los receptores β_2 interactúan mayoritariamente con proteínas Gs, aunque también pueden hacerlo con Gi, mientras que los β_3 , al contrario que los β_2 , interactúan mayoritariamente con Gi y, en menor medida, con Gs (Philipp & Hein, 2004).

A nivel subcelular, los β ARs se expresan en neuronas catecolaminérgicas a nivel postsináptico y presináptico (Aoki *et al.*, 1989), así como en astrocitos asociados a estas neuronas (Aoki & Pickel, 1992). Numerosas evidencias funcionales indican la acción de los β ARs en sinapsis glutamatérgicas y los datos estructurales corroboran esto, mostrando su expresión en la zona activa presináptica en las capas III-V de la corteza cerebral (Ferrero *et al.*, 2013a) (Figura 8).

Los receptores β_1 y β_2 forman homo y heterodímeros (Mercier *et al.*, 2002). Después de su activación, los β ARs son fosforilados por PKA, PKC o quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK), y esto reduce la activación de las proteínas G triméricas. Estas fosforilaciones reclutan la β -arrestina preparando al receptor para su internalización. En los endosomas los

receptores son desfosforilados y reciclados a la membrana o degradados en lisosomas (Lohse *et al.*, 1990; Fu & Xiang, 2015; Beaudrait *et al.*, 2017).

Liberación de Glutamato. Señalización presináptica de los β ARs.

La vía canónica de señalización de los β ARs implica su acoplamiento a proteínas Gs, que activan la adenilato ciclasa y la generación de AMPc (Figura 8), aunque bajo ciertas condiciones puede inhibir esta enzima acoplándose a Gi (Daaka *et al.*, 1997). Además, la interacción con β -arrestina, propia de la desensibilización de los receptores, puede iniciar mecanismos de señalización independientes de proteínas G (Shenoy & Lefkowitz, 2011).

Se ha demostrado que la activación de los β ARs potencia la transmisión sináptica en distintas regiones cerebrales, incluyendo la corteza (Huang & Hsu, 2006; Kobayashi *et al.*, 2009). Además, estos receptores también potencian la liberación de glutamato en preparaciones de sinaptosomas de corteza cerebral (Herrero & Sanchez-Prieto, 1996; Millan *et al.*, 2003b).

Los cambios en la neurotransmisión sugieren que estos fenómenos tienen un origen presináptico, tal como proponen algunos estudios (Kobayashi *et al.*, 2009). Sin embargo, la potenciación dependiente de β ARs también incrementa las corrientes de los receptores NMDA y es sensible a los antagonistas de estos receptores. Por lo tanto, la potenciación de la transmisión sináptica por los β ARs presenta componentes pre y postsinápticos (Ji *et al.*, 2008) de acuerdo con la expresión de estos receptores en ambos compartimentos sinápticos (Ferrero *et al.*, 2013a).

La potenciación de la liberación de glutamato por los β ARs depende de la modulación de los VDCCs de tipo P/Q y N (Huang & Kandel, 1996; Huang *et al.*, 1998) y es bloqueada por cadmio (Ji *et al.*, 2008). Esta potenciación también se ha relacionado con la PKA (Gereau & Conn, 1994; Herrero & Sanchez-Prieto, 1996), de acuerdo a la capacidad de esta quinasa de regular los VDCCs (Millan *et al.*, 2003b) y de modular la actividad de diversas proteínas de la maquinaria

exocitótica como sinapsina 1 (Menegon *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2018), SNAP-25 (Nagy *et al.*, 2004) o RIM1 α (Lonart *et al.*, 2003). No obstante, existen otros mecanismos de acción del AMPc PKA-independientes que modulan la liberación de glutamato y que implican a la proteínas Epac (del inglés *Exchange Proteins directly Activated by cAMP*) (Kaneko & Takahashi, 2004; Gekel & Neher, 2008; Ferrero *et al.*, 2013a; Zhao *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2015).

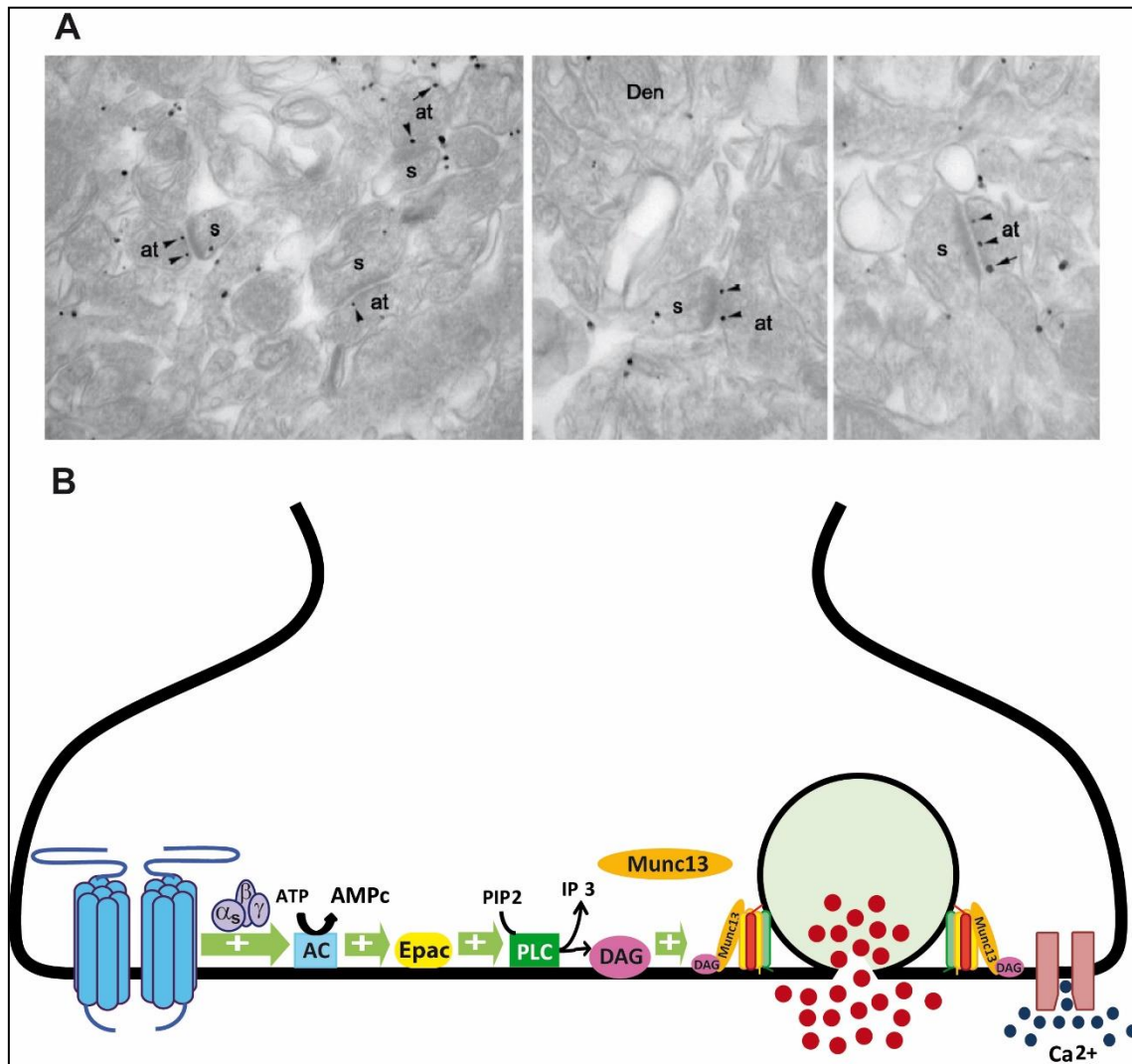


Figura 8. Localización y señalización del receptor β adrenérgico. (A) Los β ARs se localizan en la zona presináptica en distintas áreas del cerebro, incluyendo las capas III-V de la corteza cerebral (Ferrero *et al.*, 2013a). (B) Ruta de potenciación de la liberación del glutamato inducida por la activación de los β ARs y basada en la síntesis de AMPc que activará a la proteína Epac lo que a su vez incrementará los niveles de DAG y la traslocación de Munc13 a la membrana de la zona activa para iniciar la preparación de la VS para su fusión.

Aunque la principal diana del AMPc es la proteína quinasa A (PKA), existen otras proteínas que pueden ser activadas por este nucleótido, además de la proteína Epac, como son los canales iónicos operados por nucleótidos cíclicos o CNG, permeables a K^+ y Na^+ , que generan la denominada corriente de entrada activada por hiperpolarización (I_h) (He *et al.*, 2014) y que se han relacionado a nivel presináptico con la potenciación de la liberación de la neurotransmisión (Park *et al.*, 2011).

La PKA facilita la liberación de neurotransmisores mediante el control de la excitabilidad neuronal, la entrada de Ca^{2+} , y el reclutamiento y fusión de las VSs. Estas funciones están mediadas por la fosforilación de diferentes proteínas, principalmente canales iónicos y proteínas de la maquinaria exocitótica. PKA fosforila canales de K^+ , aumentando la actividad de los Kir6.2 o disminuyendo la cinética de apertura de las subunidades SUR1 (Beguin *et al.*, 1999). Además, fosforila diversas subunidades de los VDCCs, promoviendo su activación e incrementando la entrada de Ca^{2+} (Hell *et al.*, 1995).

Respecto a las proteínas de la maquinaria exocitótica, PKA fosforila a CSP (del inglés *Cysteine String Protein*) alterando su interacción con syntaxina y sinaptotagmina y prolongando la apertura del poro de fusión (Evans & Morgan, 2002). La fosforilación de la proteína de las VSs snapina o SNAP25BP, favorece la formación del complejo SNARE por medio de su interacción con SNAP-25 (Chheda *et al.*, 2001). Además, la fosforilación de SNAP-25 es necesaria para el mantenimiento del RRP (Nagy *et al.*, 2004). Por otro lado, PKA fosforila a sinaptotagmina 12 lo que se va a traducir en un incremento de la liberación espontánea (Maximov *et al.*, 2007). Asimismo se ha descrito que PKA fosforila las proteínas RIM (Lonart *et al.*, 2003) y las proteínas complexinas, lo que también incrementa la liberación espontánea (Cho *et al.*, 2015).

Proteínas Epac.

Las proteínas Epac son factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF) para proteínas G pequeñas activadas directamente por AMPc. Presentan cuatro isoformas, Epac1 y tres isoformas de Epac2 (A, B y C) (Figura 9). Epac1 se distribuye de manera ubicua en el organismo aunque su expresión en el cerebro adulto es reducida. Por el contrario, la expresión de Epac2A está mucho más localizada en el SNC, fundamentalmente en corteza, hipocampo, habénula y cerebelo (Kawasaki *et al.*, 1998). Epac2A se localiza próxima a la membrana plasmática (Niimura *et al.*, 2009). Por el contrario, Epac 2B es exclusiva de la glándula adrenal y Epac 2C se expresa solo en el hígado.

Tanto Epac1 como Epac2 presentan una región N-terminal reguladora y una región C-terminal catalítica. La región reguladora contiene un dominio de alta afinidad para AMPc (CNB-B) y un dominio DEP (Dishevelled, Egl-10, Plecstrina) responsable de la asociación a membrana en ambas isoformas y un dominio de baja afinidad por AMPc (CNB-A) en Epac2A. La región catalítica contiene un dominio de homología CDC25 que es el que presenta la actividad GEF para proteínas G pequeñas de la familia Ras, un motivo REM (motivo de intercambio con Ras) y un dominio RA con el que interacciona con Ras (Figura 9).

Cuando Epac2 se encuentra inactiva, la región reguladora está en una conformación de auto-inhibición mediante la interacción de CNB-B con REM y CDC25HD. En este estado, la proteína Rap1 no puede interaccionar con Epac. La unión de AMPc a CNB-B da lugar a un cambio conformacional que abre la región catalítica permitiendo que el dominio CDC25HD lleve a cabo la actividad GEF mediante su interacción con Rap1 (Rehmann *et al.*, 2008).

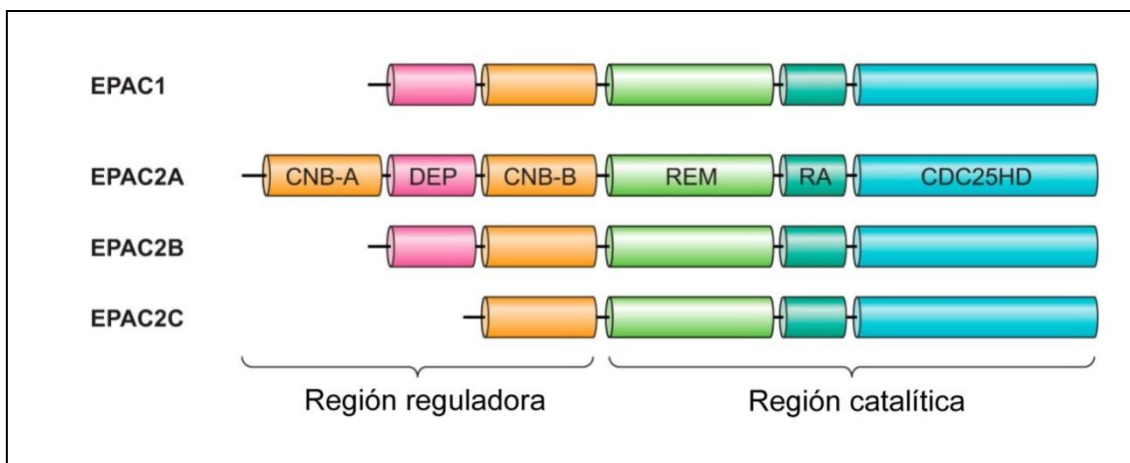


Figura 9. Estructura de Epac. La proteína Epac presenta 4 isoformas distintas, siendo Epac 2A la más abundante en el cerebro. Contiene dos dominios CNB (A y B) de baja y alta afinidad respectivamente, un dominio DEP para asociarse a las membranas, dos dominios REM y RA para interaccionar con Ras y un dominio CDC25HD con actividad GEF (Robichaux & Cheng, 2018)

Se ha descrito la interacción de las proteínas Epac con numerosas proteínas: con el dominio PDZ de RIM2 y Piccolo (Ozaki *et al.*, 2000), con las proteínas MAP1 (proteína asociada a los microtúbulos) y microtubulina del citoesqueleto (Borland *et al.*, 2006) y con la proteína Ras (Liu *et al.*, 2008), entre otras. Además, se ha observado una reducción en los niveles de Rab3a en el ratón KO para Epac2, lo que sugiere una posible interacción con esta proteína (Fernandes *et al.*, 2015). Por tanto, parece que la proteína Epac está implicada en la neurotransmisión en numerosas regiones del sistema nervioso como el cáliz de Held (Gekel & Neher, 2008), neuronas de corteza cerebral (Huang & Hsu, 2006), de cerebelo (Ster *et al.*, 2007), o de hipocampo (Gelinas *et al.*, 2008a; Ster *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2015). La importancia de Epac en los mecanismos de liberación de neurotransmisores se ha demostrado claramente en el estudio del ratón KO para Epac1 y Epac2 y en la plasticidad a largo plazo (LTP) (Yang *et al.*, 2012). El ratón KO para Epac2 también muestra deficiencias en la potenciación a largo plazo y en la modulación por AMPc (Fernandes *et al.*, 2015).

Epac también está implicada en la potenciación de la exocitosis en tejidos no neurales, como células beta secretoras de insulina (Holz, 2004) y en la reacción acrosómica de los espermatozoides (Branham *et al.*, 2006; Lucchesi *et al.*, 2016).

Se ha observado que la generación de AMPc por el activador de la AC forskolina, así como la aplicación del activador específico de Epac 8-pCPT-2'O-Me-cAMP (8-pCPT), potencian la liberación de glutamato (Ferrero *et al.*, 2013a). Sin embargo, los mecanismos de señalización de Epac en la potenciación de la liberación de neurotransmisores no han sido establecidos de manera inequívoca. Son varias las opciones de señalización de Epac para potenciar la liberación de neurotransmisor por medio de un incremento en el RRP: 1) la interacción directa y activación de la proteína RIM (Ozaki *et al.*, 2000; Kashima *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2012); 2) la activación directa de Rab3A por medio de la actividad GEF de Epac; 3) la activación de PLC ϵ , mediada por la diana de Epac Rap2B (Schmidt *et al.*, 2001) como ocurre en la secreción de insulina (Dzhura *et al.*, 2011); 4) la activación de la proteína Munc13.

También se ha relacionado la acción de Epac con el mantenimiento del tamaño RRP, en base a la disminución de este observada en el ratón KO para Epac2 (Fernandes *et al.*, 2015). Además, Epac previene el silenciamiento presináptico inducido por la activación por cannabinoides del receptor CB1 (Ramírez-Franco *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2017).

Los valores de Kd de la unión de AMPc a Epac1 y 2 son 4 y 1,2 μ M, respectivamente (de Rooij *et al.*, 2000) y resultan mucho mayores que los de la unión de AMPc a PKA (5,0 – 24,6 nM) (Ringheim & Taylor, 1990), por lo que Epac actuaría a un rango de concentraciones de AMPc mayores. Respecto a la farmacología de Epac, se dispone del activador ortostérico 8-pCPT-2'O-Me-cAMP, que activa específicamente tanto Epac1 como Epac2 (Vliem *et al.*, 2008), así como de diferentes inhibidores de Epac2, aunque solo ESI-05 es un inhibidor específico (Rehmann, 2013).

Modulación de la maquinaria exocitótica por los β ARs.

En sinaptosomas de corteza cerebral la potenciación de la liberación de glutamato por activación del receptor β AR con el agonista isoproterenol es insensible al inhibidor de PKA H-89 (Ferrero *et al.*, 2013a), pero se bloquea con el inhibidor de Epac 2 ESI-05 (Alonso *et al.*, 2017). Además, el agonista de Epac 8-pCPT ocluye la potenciación inducida por isoproterenol (Ferrero *et al.*, 2013a), lo que sugiere que esta potenciación depende exclusivamente de Epac y no, de PKA. Además, sorprendentemente, tanto la potenciación de la liberación los receptores β ARs, como por 8-pCPT, son sensibles a los inhibidores farmacológicos de la PLC (Ferrero *et al.*, 2013a), que no solo inhiben completamente la actividad de PLC determinada por la acumulación de IP_1 , sino que también impiden la activación/translocación de Munc13.

Hay formas de PLC como las de la familia ϵ que pueden ser activadas por proteínas G pequeñas o monoméricas de la familia Ras, entre las que se incluye la proteína Rap (Smrcka *et al.*, 2012). La proteína Epac, también denominada Rap-GEF, es una proteína con actividad intercambiadora de nucleótidos de guanina que activa proteínas G pequeñas (de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998). Se ha descrito que Epac puede activar PLC ϵ por medio de su diana Rap2B (Schmidt *et al.*, 2001). Por lo tanto, es probable que, en los mecanismos de potenciación de la liberación de glutamato estudiados, Epac active PLC ϵ por medio de las proteínas Rap.

La proteína Munc13 es una proteína regulada por la unión a DAG y CaM (Augustin *et al.*, 1999; Lipstein *et al.*, 2012) esencial en la preparación de las VSs para su liberación. Munc13 se trasloca a la membrana plasmática como consecuencia de su activación por la unión de DAG (Betz *et al.*, 1998; Augustin *et al.*, 1999; Rhee *et al.*, 2002). Además, la activación de Munc13 requiere la interacción con la proteína RIM, que evita la formación del dímero autoinhibitorio (Deng *et al.*, 2011a). RIM interacciona a su vez con la proteína G pequeña de las VSs, Rab3a, formando un complejo triple entre estas tres proteínas, necesario para la preparación de las VSs para la exocitosis

(Dulubova *et al.*, 2005; Andrews-Zwilling *et al.*, 2006). La unión de RIM-Rab3 depende de la activación de Rab3 por medio del intercambio de GDP por GTP (Wang *et al.*, 2000). Por lo tanto, Epac, a través de su actividad GEF activadora del intercambio de GDP por GTP, podría llevar a cabo esta función de activación de Rab3.

Esto explicaría que la potenciación de la liberación de glutamato por los receptores β ARs esté asociada a un acercamiento de las VSs a la membrana de la zona activa (Ferrero *et al.*, 2013a).

Plasticidad sináptica dependiente de AMPc

Los β ARs participan en la inducción de la LTP en el hipocampo (Thomas *et al.*, 1996; Gelinas & Nguyen, 2005; O'Dell *et al.*, 2015; Ul Haq *et al.*, 2016), reduciendo el umbral para su inducción. Además, el bloqueo de los β ARs evita el desarrollo de la fase tardía de LTP (Huang & Kandel, 1996). Concretamente se ha observado que la activación de los receptores β 1 en la corteza prefrontal ante una situación de estrés afecta al proceso cognitivo y que el empleo de un antagonista específico recupera la formación de la memoria de trabajo (Ramos *et al.*, 2005).

Se ha propuesto que estos mecanismos de potenciación podrían depender de la activación de la PKA (Gelinas *et al.*, 2008b; Zhou *et al.*, 2013a) o Epac (Gelinas *et al.*, 2008a) y de la vía ERK/mTOR (Gelinas *et al.*, 2007), que induce la síntesis de proteínas (Gelinas & Nguyen, 2005). Además, Epac mantiene el tamaño RRP necesario para el desarrollo de estos procesos de plasticidad (Fernandes *et al.*, 2015).

Otras formas de plasticidad sináptica dependientes de AMPc se han caracterizado en base a la implicación de las proteínas RIM, que participan en procesos de potenciación de la liberación a corto y largo plazo (Kaesler & Sudhof, 2005; Mittelstaedt *et al.*, 2010). En este sentido, el ratón KO para RIM1 α

muestra deficiencias en la STP determinada por pares de pulsos y trenes de pulsos en rodajas de hipocampo (Schoch *et al.*, 2002).

RIM1 α también participa en la LTP dependiente de AMPc/PKA en las fibras musgosas de hipocampo y cerebelo (Castillo *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005). El fenotipo del raton KO de RIM1 α es similar al observado en el animal KO de Rab3 (Huang *et al.*, 2005), por lo que se ha postulado que estas proteínas actúan conjuntamente. Sin embargo, la fosforilación de RIM en la Ser413, propuesta como necesaria para el desarrollo de la LTP (Lonart *et al.*, 2003), ha sido cuestionada (Kaesler *et al.*, 2008a; Yang & Calakos, 2010). Otros estudios confirman la implicación de RIM1 α en procesos de plasticidad dependientes de AMPc en las fibras musgosas hipocampales (Pelkey *et al.*, 2008). En este último caso, se ha señalado que la interacción entre RIM y el receptor mGlu7 limita la actuación de RIM, pero que la activación prolongada e internalización del receptor liberaría la proteína RIM, propiciando el desarrollo de la LTP dependiente de AMPc (Pelkey *et al.*, 2008).

En muchas de las formas de plasticidad dependientes de AMPc, en las que se ha establecido la participación de componentes de esta vía de señalización, se desconoce si los β ARs juegan algún papel. Este es el caso de la LTP de las sinapsis cerebelares entre las fibras paralelas y las células de Purkinje, donde una de sus formas de LTP es presináptica e implica un incremento en la liberación de neurotransmisor mediado por la activación de la adenilato ciclasa y las proteínas RIM (Salin *et al.*, 1996; Castillo *et al.*, 2002; Lonart *et al.*, 2003).

Fosfodiesterasas

El AMPc es degradado por las fosfodiesterasas (PDEs) que lo transforman en 5'-AMP. La superfamilia de las PDEs está constituida por 11 miembros que presentan distintas características y localización (Tabla 1)

Tabla 1. Tipos de PDEs, afinidad, regulación y regiones de mayor expresión en el SNC.

Tipo	Isoenzimas	Regulación	Sustrato	Área donde se expresa mayoritariamente (SNC)
PDE1	A, B, C	(+) Ca ²⁺ -CaM	AMPc/GMPc	Hipocampo, corteza, bulbo olfatorio, estriado, tálamo, amígdala y cerebelo
PDE2	A	(+) GMPc	AMPc/GMPc	Hipocampo, corteza, estriado, hipotálamo, amígdala y mesencéfalo
PDE3	A, B	(-) GMPc	AMPc/GMPc	
PDE4	A, B, C, D		AMPc	Hipocampo, corteza, bulbo olfatorio, estriado, tálamo, hipotálamo, amígdala y cerebelo
PDE5	A		GMPc	Hipocampo, corteza, cerebelo
PDE6	A, B, C		GMPc	Glándula pineal
PDE7	A, B		AMPc	Hipocampo, corteza, bulbo olfatorio, estriado, tálamo, hipotálamo y mesencéfalo
PDE8	A, B		AMPc	Hipocampo, corteza, bulbo olfatorio, estriado, tálamo, hipotálamo y mesencéfalo
PDE9	A		GMPc	Hipocampo, corteza, bulbo olfatorio, estriado, tálamo, hipotálamo, amígdala, mesencéfalo y cerebelo
PDE10	A	(-) AMPc	AMPc/GMPc	Hipocampo, corteza, estriado, mesencéfalo y cerebelo
PDE11	A		AMPc/GMPc	

Los símbolos (+) y (-) indican activación e inhibición respectivamente (Lakics *et al.*, 2010; Heckman *et al.*, 2015).

La fosfodiesterasa 2 (PDE2) es la más abundante en la corteza cerebral y la fosfodiesterasa 4B (PDE4B) es abundante en la mayor parte de las regiones del SNC (Lakics *et al.*, 2010). Ambas están formadas por una región N-terminal donde se encuentra el dominio regulador y una región C-terminal donde está el dominio catalítico encargado de hidrolizar el AMPc o el GMPc. PDE4B es

selectiva para el AMPc, mientras que PDE2 actúa tanto sobre AMPc, como GMPc.

PDE2 presenta tres variantes (A1, A2 y A3) que difieren en su localización subcelular, ya que A1 es soluble, mientras que A2 y A3 están asociadas a la membrana. PDE2 funciona como homodímero gracias a unos dominios GAF (de unión a GMPc, adenilato ciclasa y Fh1A) que, además, regulan su actividad catalítica en respuesta al GMPc. El GMPc actúa como activador de la enzima, de tal manera que, cuando se une a uno de los dominios GAF, induce un cambio conformacional incrementando la actividad enzimática para el AMPc hasta 6 veces. La enzima hidroliza tanto el AMPc como el GMPc, pero en condiciones basales presenta más afinidad por este último (Zhang, 2015).

PDE4B presenta 4 variantes distintas (B1, B2, B3 y B4). Al contrario que PDE2, las PDE4 carecen de los dominios GAF y son reguladas por fosforilación en unos dominios localizados en la región N-terminal denominados UCR1 y 2 (del inglés *Upstream Conserved Regions*). En función de si presentan ambos dominios se clasifican en largas (B1, B3 y B4) y cortas (B2), que tienen solo UCR2 (Fertig & Baillie, 2018). En condiciones basales, UCR1 interacciona con UCR2 lo que conlleva a una inhibición de la actividad enzimática. Cuando PKA fosforila a UCR1 induce un cambio conformacional y la interacción con UCR2 cesa lo que activa al enzima (Beard *et al.*, 2000).

2. El síndrome del X frágil

El síndrome del X frágil, FXS (del inglés *Fragile X Syndrome*), es la causa más frecuente de retraso mental hereditario y de autismo de origen genético. En 1943 Martin y Bell observaron que 11 hijos de una familia manifestaban indicios de retraso mental y 25 años después, al reexaminar a 7 de los 11 hijos, se observó un punto de constricción en el brazo largo del cromosoma X donde se identificó el *Fragile X mental retardation gene 1* (*Fmr1*) (Melancia & Trezza, 2018).

El FXS se debe a una ausencia de la *Fragile X Mental Retardation Protein* (FMRP), la cual es codificada por el gen *Fmr1*. La carencia de esta proteína tiene su origen en la metilación del gen *Fmr1* como resultado de la expansión de un triplete de CGG en la región no codificante del primer exón hasta un número superior a 200 repeticiones. Como consecuencia de ello, aparecen múltiples manifestaciones clínicas, en su mayoría ligadas al sistema nervioso, ya que FMRP se expresa mayoritariamente en cerebro y células espermáticas. Entre los rasgos más frecuentes están: anomalías craneofaciales características con cara alargada y mandíbula prominente, retraso mental, ansiedad, labilidad emocional, déficit de atención, problemas de sueño y macroorquidismo.

A nivel del sistema nervioso, se ha observado que en ausencia de FMRP hay un aumento significativo del número de espinas dendríticas en las neuronas así como un incremento en la cantidad de espinas inmaduras, las cuales se caracterizan por ser más finas, largas y retorcidas (He & Portera-Cailliau, 2013).

Esta enfermedad es relativamente poco frecuente con una penetrancia del 80% en hombres y del 30-50% en mujeres afectando a 1 de 4000 hombres y a 1 de 7000 mujeres (Mila M, 2017).

Las manifestaciones clínicas de este síndrome son dispares entre hombres y mujeres, dado que estas últimas poseen un segundo cromosoma X que suple parcialmente la carencia de FMRP. En las mujeres, la apariencia física suele ser normal, así como el nivel de inteligencia. Sin embargo, son más propensas a manifestar cambios de humor, aislamiento social y depresión (Melancia & Trezza, 2018).

2.1. Gen *Fmr1*.

El gen *Fmr1* está constituido por 17 exones que codifican un mRNA de 4,4 kb que da lugar a 12 isoformas de FMRP de entre 70-80kD. Este gen incluye una región metilada seguida por un promotor, una zona de CGG y la secuencia

codificante. A su vez, el promotor contiene una isla CpG y tres motivos iniciadores (InR). Se cree que la región CGG actúa como reguladora de la transcripción del gen (Tabolacci *et al.*, 2016) (Figura 10).

El número de repeticiones de la secuencia CGG es variable (Figura 10). De 6 a 44 se considera normal, de 45 a 54 se considera como *gray zone* en la que los alelos pueden presentar una ligera inestabilidad (alelos intermedios) y dar lugar a una expansión del triplete que origine un estado de premutación. Esta situación es bastante frecuente, ya que aparece en un porcentaje de la población que oscila entre 0,8 y 3%. De 55 a 200 repeticiones se considera como un estado de premutación en el que aún se produce la transcripción y traducción del gen y la isla CpG no está metilada. Además, la secuencia de la proteína FMRP no está afectada, puesto que las secuencias CGG se localizan en una región no traducida del ARNm (Hall & Berry-Kravis, 2018). Estos individuos son asintomáticos, no obstante, pueden tener un déficit en la síntesis de FMRP así como un aumento de los niveles de ARNs mensajeros. Asimismo, existe el riesgo de que su descendencia herede un número de repeticiones demasiado elevado que conlleve al desarrollo de la enfermedad e, incluso, pueden llegar a manifestar ciertas patologías asociadas a este número de repeticiones. Las dos patologías más frecuentes son la insuficiencia ovárica prematura asociada al X frágil (FXPOI), relacionada con la aparición de la menopausia antes de los 40 años y con una disminución de la fertilidad, y temblor/ataxia asociados al X frágil (FXTAS), enfermedad neurodegenerativa caracterizada por temblor cinético, ataxia cerebelar, parkinsonismo y neuropatía. Finalmente, cuando las repeticiones son superiores a 200 aparece la patología. El límite entre la región metilada y el promotor desaparece, produciéndose la metilación, tanto del promotor, como de la región CGG (Tabolacci *et al.*, 2016; Mila M, 2017; Hall & Berry-Kravis, 2018).

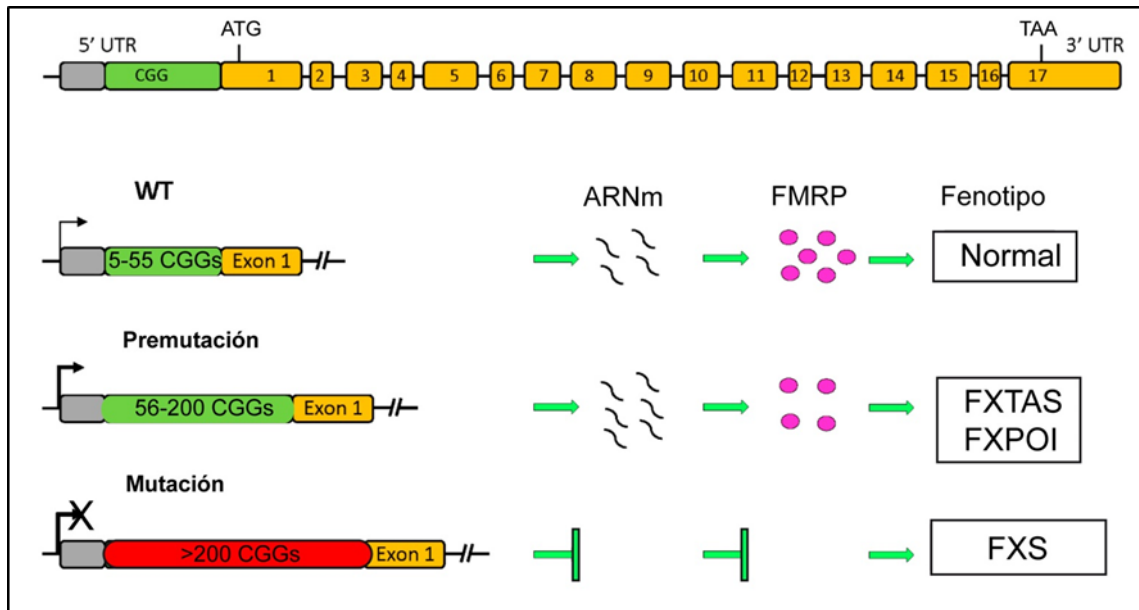


Figura 10. Estructura del gen *Fmr1*. En base a la expansión del triplete CGG se dan las distintas variaciones: normal o WT, premutada con mayor índice de transcripción y menor de traducción de FMRP y relacionada con insuficiencia ovárica prematura asociada al X frágil (FXPOI) y temblor/ataxia asociados al X frágil (FXTAS) y mutación completa sin transcripción ni traducción. Basado en (Tabolacci *et al.*, 2016).

2.2. Proteína FMRP.

La proteína FMRP se expresa mayoritariamente en cerebro y células espermáticas, aunque es ubicua en fases tempranas del desarrollo. En el citoplasma se asocia a los polirribosomas del retículo endoplásmico rugoso y a los ribosomas libres de las dendritas, sin embargo, es capaz de introducirse en el núcleo para unir el ARNm y transportarlo al citoplasma para su traducción. Además, FMRP mantiene la estructura de la cromatina, participa en la respuesta al daño del ADN y favorece la supervivencia celular por medio de la vía PI3K-Akt (Jeon *et al.*, 2011; Alpatov *et al.*, 2014).

FMRP contiene varias regiones de interés. Presenta una región N-terminal caracterizada por la presencia de dos dominios Tudor (TD) capaces de unir homopolímeros de RNA así como ARN pequeños no codificantes. La región central tiene dos dominios K homólogos (KH) por donde la proteína se asocia directamente con polirribosomas (Darnell *et al.*, 2011) y una señal de

exportación nuclear (NES). La región C-terminal posee una caja RGG (un motivo rico en arginina y glicina) que también interacciona con el ARNm (Fernandez *et al.*, 2013)(Figura 11).

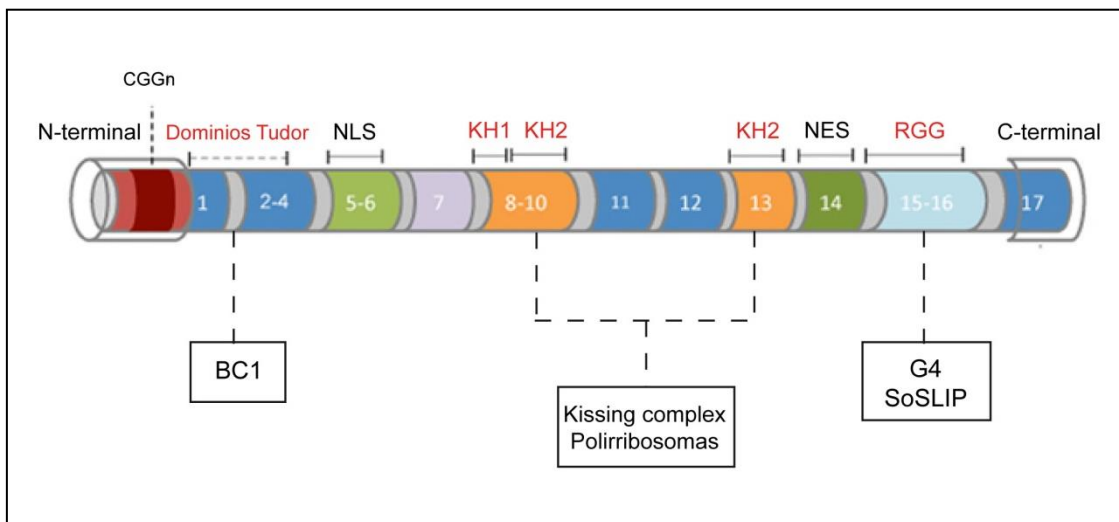


Figura 11: Estructura de la proteína FMRP. En el esquema se indican los dominios de interacción con las estructuras secundarias de los ARNms (kissing complex, G4 y SoSLIP), así como la región del dominio N-terminal donde interacciona con ARNs de pequeño tamaño como BC1. Basado en (Fernandez *et al.*, 2013).

FMRP forma homodímeros e interacciona con múltiples proteínas nucleares y citoplasmáticas relacionadas con el metabolismo del ARNm, así como con la remodelación del citoesqueleto (Fernandez *et al.*, 2013; Nolze *et al.*, 2013). Por tanto, FMRP regula el transporte, la estabilidad y la síntesis local de proteínas procedentes de cientos de ARNms en el cerebro. Además, une ARNs no codificantes y unos cuantos microARNs (Davis & Broadie, 2017).

La interacción entre FMRP y el ARNm es posible gracias a las estructuras secundarias de este último (Santoro *et al.*, 2012) (Figura 11). La más destacada es la G4 formada entre secuencias ricas en guanina que interaccionan entre sí mediante puentes de hidrógeno. FMRP es capaz de interaccionar con esta estructura gracias a la caja RGG presente en su dominio C-terminal (Darnell *et al.*, 2001). Otra estructura del ARNm que también favorece la interacción con FMRP son los dominios ricos en uracilo (Chen *et al.*, 2003), aunque se desconoce

qué parte de la estructura de FMRP interacciona con dichos dominios. Los dominios KH2 de FMRP permiten su interacción con los *Kissing complex* del ARN (Darnell *et al.*, 2005), sin embargo, este tipo de estructura solo se da *in vivo* cuando interaccionan dos ARNs, lo cual explicaría por qué FMRP interacciona con algunos ARNms gracias a moléculas de ARN adaptadoras como BC1 (Zalfa *et al.*, 2003; Zalfa *et al.*, 2005) o a microARNs. Finalmente, se ha observado que FMRP interacciona con el ARNm de la superóxido dismutasa gracias a unas estructuras denominadas SoSLIP (del inglés *Sod 1 Stem Loops interacting with FMRP*) que también interaccionan con la caja RGG del dominio C-terminal (Bechara *et al.*, 2009).

FMRP transporta el ARNm del soma a las sinapsis en asociación dinámica con los transportadores de microtúbulos (Dictenberg *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008) por lo que la falta de FMRP altera la síntesis de las correspondientes proteínas sinápticas (Bhakar *et al.*, 2012; Sidorov *et al.*, 2013). Además, FMRP regula la estabilidad de los ARNms, por lo que la ausencia de dicha proteína conlleva alteraciones en la cantidad de estos mensajeros.

FMRP regula la traducción de los ARNs mensajeros y, generalmente, funciona como un represor de este proceso. Esta función depende del nivel de fosforilación de FMRP por la vía de mTOR (del inglés *Mammalian Target of Rapamycin*) en el residuo de serina 500 para seres humanos y 499 para roedores (Santoro *et al.*, 2012). Cuando FMRP está fosforilada, realiza una función represora de la síntesis de proteínas que cesa con la defosforilación (Fernandez *et al.*, 2013). En condiciones basales, FMRP se encuentra tanto en forma fosforilada como defosforilada aunque es la forma fosforilada la más abundante. A pesar de que la fosforilación no altera la capacidad de FMRP para interaccionar con el ARNm, sí afecta a su interacción con los polirribosomas y su capacidad para inhibir la traducción del ARNm (Santoro *et al.*, 2012). Además, la represión de la traducción del ARNm s consecuencia de la unión de FMRP no solo a los ribosomas, sino, también, a microARNs y a componentes del RISC (del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*) (Muddashetty *et al.*, 2011).

Por otro lado, FMRP también puede actuar como un activador de la traducción de proteínas (Maurin & Bardoni, 2018) como la superóxido dismutasa 1 (Bechara *et al.*, 2009) o AKAP (del inglés *large A-Kinase Anchor Protein*) (Sears *et al.*, 2019), entre otras (Greenblatt & Spradling, 2018).

FMRP se localiza en gránulos de RNA en las dendritas y espinas (Antar *et al.*, 2004), en los axones en desarrollo (Antar *et al.*, 2006; Parvin *et al.*, 2018) y en los axones maduros (Akins *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2015b). Esto, sumado a su participación en la síntesis de proteínas, indica que FMRP tiene todas las características necesarias para ejercer un papel importante como regulador de la síntesis proteica local en los terminales pre y postsinápticos tanto en el desarrollo, como en la vida adulta (Liu *et al.*, 2018; Patzlaff *et al.*, 2018).

Actualmente se sabe que la proteína FMRP regula la traducción de múltiples proteínas a nivel postsináptico como PSD-95, neuroliquinas, α -CamKII o MAP1B (Hou *et al.*, 2006; Kao *et al.*, 2010; Ifrim *et al.*, 2015; Chmielewska *et al.*, 2019). Sin embargo, se tiene un menor conocimiento sobre sus acciones a nivel presináptico, a pesar de que FMRP interacciona con los ARNms de, al menos, un tercio de las proteínas de la presinapsis como es el caso de Bassoon, adenilato ciclasa 1, Munc18 y protein kinasa C β entre otros (Darnell *et al.*, 2011) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Algunas proteínas reguladas por FMRP.

Gen	Proteína	Gen	Proteína
Maquinaria exocitótica		Canales iónicos	
BSN	Bassoon	SCN2A	Canal de Na ⁺ voltaje-dependiente tipo II (subunidad α)
PCLO	Piccolo	SCN8A	Canal de Na ⁺ voltaje-dependiente tipo VIII (subunidad α)
UNC13A	Unc-13 homólogo A	KCNB1	Canal de K ⁺ voltaje-dependiente subfamilia Shab miembro 1
UNC13C	Unc-13 homólogo C	KCNH1	Canal de K ⁺ voltaje-dependiente subfamilia H miembro 1
STXBP1	Proteína de unión a syntaxina 1	KCNH3	Canal de K ⁺ voltaje-dependiente subfamilia H miembro 3
STXBP1	Proteína de unión a syntaxina 5	KCNH7	Canal de K ⁺ voltaje-dependiente subfamilia H miembro 7
SYN1	Sinapsina 1	KCNC3	Canal de K ⁺ voltaje-dependiente subfamilia Shaw miembro 3
RIMBP2	Proteína de unión a RIM 2	KCNT1	Canal de K ⁺ subfamilia T miembro 1
SYT1	Sinaptotagmina I	KCNQ2	Canal de K ⁺ voltaje-dependiente subfamilia KQT miembro 2
SYT7	Sinaptotagmina VII	KCNQ3	Canal de K ⁺ voltaje-dependiente subfamilia KQT miembro 3
UNC18	Munc18	KCND2	Canal de K ⁺ voltaje-dependiente subfamilia Shal miembro 2
Receptores		KCN2A	Canal de K ⁺ voltaje-dependiente subfamilia Shaker miembro 2
GABBR1	Receptor GABA B1	KCNMA1	Canal BK
GABBR2	Receptor GABA B2	CACNA1A	VDCC tipo P/Q (subunidad $\alpha 1A$)
GRIN1	Receptor NMDA 1	CACNA1B	VDCC tipo N (subunidad $\alpha 1B$)
GRIN2A	Receptor NMDA 2A	CACNA1E	VDCC tipo R (subunidad $\alpha 1E$)
GRIN2B	Receptor NMDA 2B	CACNA1G	VDCC tipo T (subunidad $\alpha 1G$)
GRIK3	Receptor kainato 3	CACNA1I	VDCC tipo T (subunidad $\alpha 1I$)
GRIK5	Receptor kainato 5	CACNB1	VDCC subunidad $\beta 1$
GRM4	Receptor mGlu4	CACNB3	VDCC subunidad $\beta 3$
GRM5	Receptor mGlu5	Vía del AMPc	
ADRBK1	Proteína quinasa 1 del receptor β adrenérgico	ADCY1	Adenilato ciclasa 1
Vía del DAG		ADCY5	Adenilato ciclasa 5
DGKZ	DAG kinasa κ	PDE2A	Fosfodiesterasa 2A
DAGLA	DAG lipasa α	PDE4B	Fosfodiesterasa 4B
PRKCE	Proteína quinasa C ϵ	PDE8B	Fosfodiesterasa 8B
PRKCB	Proteína quinasa C β	PRKACB	Proteína kinasa A subunidad catalítica
PRKCG	Proteína quinasa C γ	Otras proteínas	
PLCH2	Fosfolipasa C $\eta 2$	CALM3	Calmodulina 3
PCLB1	Fosfolipasa C $\beta 1$	GLUL	Glutamina sintetasa

(Darnell *et al.*, 2011; Parvin *et al.*, 2018)

2.3. Alteraciones de la función sináptica y de la modulación por GPCRs

La proteína FMRP es un inhibidor de la síntesis de proteínas presentes en las espinas dendríticas de las neuronas, por lo que su ausencia da lugar a una alteración en la morfología de las espinas dendríticas siendo estas más abundantes, finas e inmaduras (Grossman *et al.*, 2006; He & Portera-Cailliau, 2013).

El déficit de FMRP presente en el FXS no solo va a tener consecuencias en la morfología de las espinas dendríticas, sino también en la funcionalidad sináptica. Así, en el hipocampo se ha observado que la LTD dependiente de los receptores mGlu del grupo I (mGlu-LTD) está exacerbada en los ratones carentes de FMRP (Huber *et al.*, 2002; Nosyreva & Huber, 2006; Pilpel *et al.*, 2009) porque la ausencia de esta proteína aumenta la traducción de ciertos ARNms y esto incrementa la internalización de receptores AMPA (Snyder *et al.*, 2001; Waung *et al.*, 2008). No obstante, este incremento en la LTD no se traduce en una depresión sináptica generalizada ya que la LTD dependiente de receptores NMDA no se encuentra alterada (Dolen & Bear, 2008). Además, este incremento en la LTD es un proceso dependiente de la edad y de la actividad de los receptores NMDA, de tal manera que, en animales *Fmr1* KO, la LTD está exacerbada a la edad de p30 para disminuir lentamente hasta llegar a p60, edad en la que disminuye drásticamente hasta casi desaparecer. Por otro lado, cuando se bloquean los receptores NMDA, la LTD se restaura a valores normales (Toft *et al.*, 2016). Este fenómeno existente en el FXS y asociado fundamentalmente a receptores mGlu5 ha dado lugar a la “teoría glutamatérgica del síndrome del X frágil” (Bear *et al.*, 2004). Asimismo, en cerebros de pacientes con FXS se ha observado una mayor expresión del receptor mGlu5 en la corteza prefrontal (Lohith *et al.*, 2013). Por todo ello, se han probado distintos fármacos orientados a antagonizar el efecto de estos receptores (Krueger & Bear, 2011), aunque ninguno ha demostrado ser eficaz a pesar de sus buenos resultados en ratones *Fmr1* KO (Michalon *et al.*, 2012; Michalon *et al.*, 2014).

La ausencia de FMRP también se asocia a cambios en la LTP, que se encuentra reducida en corteza (Wilson & Cox, 2007; Koga *et al.*, 2015b). Asimismo, la plasticidad a corto plazo STP (del inglés *Short Term Plasticity*) también está afectada. Esta forma de plasticidad es importante en el procesamiento de información, en la memoria de trabajo y en la toma de decisiones. Los ratones *Fmr1* KO muestran un incremento en la STP y una reducción en la STD, fenómenos debidos, probablemente, a un incremento en la entrada de Ca^{2+} , así como a un reciclamiento vesicular más rápido y un aumento en el RRP (Deng *et al.*, 2011b).

FMRP se expresa en sitios presinápticos donde regula el establecimiento y el mantenimiento de las conexiones sinápticas (Gibson *et al.*, 2008). Así, la pérdida de FMRP afecta a la motilidad y dinámica del cono de crecimiento axonal de neuronas de hipocampo y a las ramificaciones de los terminales de las fibras musgosas del hipocampo (Ivanco & Greenough, 2002; Antar *et al.*, 2006; Gibson *et al.*, 2008). Además, FMRP regula la expresión de proteínas presinápticas (Darnell *et al.*, 2001; Darnell *et al.*, 2011) implicadas en la liberación de neurotransmisores (Munc13, sinaptotagmina, SNAP-25, VDCCs de tipo N y P/Q, sinaptobrevina), en el reciclamiento vesicular (dinamina, bassoon, piccolo, sinapsina I), GPCRs (Proteína kinasa 1 del receptor β adrenérgico, mGlu4, mGlu5), moléculas de señalización sináptica (PKC, PKA, adenilato ciclasa, PLC, DAG lipasa), etc. Por lo que, presumiblemente, la ausencia de esta proteína tendrá repercusiones muy variadas a nivel presináptico.

FMRP interacciona directamente con canales iónicos y esto afecta a duración del potencial de acción (AP) y a la liberación de NT. Esta acción es independiente de la traducción, pero está relacionada con la interacción de FMRP con la subunidad $\beta 4$ de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (BK) de las neuronas piramidales CA3. Así, la ausencia de FMRP lleva a la pérdida de la función de repolarización de estos canales iónicos y, consecuentemente, a una mayor duración del potencial de acción durante la estimulación repetida y a una mayor liberación de neurotransmisor (Deng *et al.*, 2013; Deng & Klyachko,

2016). Por otro lado, FMRP regula la expresión de los VDCCs de tipo N y P/Q (Ferron *et al.*, 2014; Castagnola *et al.*, 2018), por lo que su ausencia podría alterar la entrada de calcio al interior del terminal sináptico.

En los ratones *Fmr1* KO se han observado alteraciones que podrían afectar la señalización y función de los receptores presinápticos que potencian la liberación de NT. En neuronas corticales, FMRP se asocia de manera prominente con el mRNA de la diacilglicerol quinasa kappa (DGK κ) una de las 10 isoformas del enzima dentro del SNC (Tu-Sekine & Raben, 2011). En ausencia de FMRP no se expresa la DGK κ y esto genera anomalías en las espinas dendríticas y alteraciones en la plasticidad sináptica que podrían estar relacionados con los mayores niveles de DAG encontrados en los pacientes de FXS (Tabet *et al.*, 2016a; Tabet *et al.*, 2016b). Si estos cambios en los niveles de DAG ocurren a nivel presináptico, podrían explicar la mayor colocación de VSs en contacto con la membrana que se ha encontrado en el hipocampo de los ratones *Fmr1* KO (Deng *et al.*, 2011b) y la mayor liberación de neurotransmisor (Deng *et al.*, 2013). Además, se podría anticipar que la potenciación de la liberación por los receptores mGlu7 y β ARs, que está asociada a un incremento de las VSs próximas a la membrana (Ferrero *et al.*, 2013a; Martin *et al.*, 2018), podría estar ocluida en los ratones *Fmr1* KO. Los receptores mGlu8 (Serajee *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008) y mGlu7 (Yang & Pan, 2013; Liu *et al.*, 2015; Noroozi *et al.*, 2016) se han relacionado con el autismo y otras anomalías del desarrollo y la activación de los mGlu4 mejora las alteraciones comportamentales asociadas con el autismo (Becker *et al.*, 2014). Asimismo, el empleo del antagonista de mGlu7, XAP044, reduce el estrés, la ansiedad y la depresión, que son síntomas característicos del FXS humano (Gee *et al.*, 2014).

En el FXS se ha descrito una alteración en la vía del AMPc (Kelley *et al.*, 2007; Kelley *et al.*, 2008). En plaquetas y linfoblastos de pacientes con este síndrome, la síntesis de AMPc está disminuida (Berry-Kravis & Sklena, 1993; Berry-Kravis *et al.*, 1995) y esta situación puede rescatarse en líneas celulares neurales que sobreexpresan FMRP (Berry-Kravis & Ciurlionis, 1998). Asimismo,

los antagonistas de receptores mGlu incrementan los niveles de AMPc y rescatan un comportamiento normal tanto en *Drosophila*, como en el ratón careante de FMRP (McBride *et al.*, 2005; Kanellopoulos *et al.*, 2012). Esta alteración en la señalización por AMPc podría constituir la base de la pérdida de la LTP en corteza anterior de los ratones *Fmr1* KO por alteración en la respuesta de PKA (Koga *et al.*, 2015b). Un exceso de actividad de las fosfodiesterasas también podría explicar el déficit de señalización del AMPc. Así, en hipocampo y corteza la ausencia de FMRP incrementa la expresión de PDE2 (Darnell *et al.*, 2011; Maurin *et al.*, 2018a) y disminuye los niveles de AMPc y GMPc acción que es revertida por la inhibición de PDE2 rescatando además las alteraciones en el comportamiento social (Maurin *et al.*, 2018b). En esta misma línea, la inhibición de la PDE4 rescata el exceso de LTD dependiente de receptores mGlu de los ratones *Fmr1* KO (Choi *et al.*, 2015).

En relación con el sistema endocannabinoide, la LTD dependiente de endocannabinoides (eCB-LTD) de las sinapsis inhibitoras de la región CA1 del hipocampo está aumentada en el ratón *Fmr1* KO por una mayor síntesis de cannabinoides (Maccarrone *et al.*, 2010; Zhang & Alger, 2010), y contrasta con las sinapsis excitadoras de la corteza prefrontal dónde se observa un déficit en la síntesis (Jung *et al.*, 2012). Esto ha llevado a proponer tanto el bloqueo de los receptores CB1 y CB2 (Busquets-Garcia *et al.*, 2013; Gomis-Gonzalez *et al.*, 2016), como la estimulación de la síntesis del 2-AG (Jung *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2015a; Qin *et al.*, 2015b) como posibles estrategias terapéuticas.

2.4. Estrategias terapéuticas.

Actualmente no existe un tratamiento eficaz para este síndrome, por lo que se recurre a medicamentos capaces de paliar los síntomas asociados, como ansiolíticos, anticonvulsivantes, psicoestimulantes y antidepresivos.

Por todo ello, se siguen buscando dianas terapéuticas que mejoren esta condición. En este sentido se han llevado a cabo múltiples ensayos dirigidos a

inhibir el receptor mGlu5 basándose en la denominada “teoría glutamatérgica” (Bear *et al.*, 2004).

Actualmente se sabe que la proteína FMRP desempeña un papel muy importante en la regulación de la traducción de proteínas originada por la activación de los receptores de glutamato del grupo I, especialmente de mGlu5. El uso de antagonistas o la disminución de la expresión de dicho receptor dan lugar a una recuperación parcial del fenotipo tanto a nivel sináptico como comportamental (Martin & Huntsman, 2012). Siguiendo esta idea, el compuesto Mavoglurant (AFQ056) de Novartis fue probado y mostró ser eficaz en pacientes que presentaban una metilación completa del gen. Sin embargo, en estudios posteriores no se obtuvieron los mismos resultados (Bailey *et al.*, 2016; Berry-Kravis *et al.*, 2016).

Otras estrategias terapéuticas han buscado la desmetilación del gen o la inhibición de las acetilasas de histonas, sin resultados satisfactorios. Un ejemplo de esto fue el compuesto 5-aza-desoxicitidina (5-azadC), un inhibidor de la metiltransferasa capaz de restaurar la transcripción y la traducción del gen *Fmr1*, el cual presenta limitaciones en su uso, dado que puede afectar a la metilación de otros genes e inducir apoptosis. Además, solo es efectivo en células que se encuentren en estado de división (Tabolacci *et al.*, 2016).

2.5. Ratón modelo del síndrome del X frágil

Hoy en día se dispone de distintos modelos animales para el estudio del FXS entre los que cabe destacar el ratón KO para el gen *Fmr1*. Este gen está altamente conservado entre distintas especies y el homólogo murino conserva el 97% de homología en aminoácidos con el humano (1994). En este ratón el gen *Fmr1* se encuentra silenciado gracias a la incorporación de un vector, pMG5, que presenta un casete génico de neomicina en el exón 5 (1994; Bernardet & Crusio, 2006).

Estos ratones tienen una fertilidad normal, así como un tamaño de camadas y una esperanza de vida iguales a la de los ratones WT (1994). Sin embargo, presentan características fenotípicas que difieren de las de animales que expresan FMRP y que, en muchos casos, se asemejan a las observadas en pacientes de FXS. Entre ellas cabe destacar la hiperactividad, alteraciones en la interacción social, problemas de aprendizaje y memoria, etc. (1994; Bernardet & Crusio, 2006; Oddi *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014). No obstante, es importante indicar que, en muchos casos, los resultados de las pruebas comportamentales realizadas a los ratones ofrecen resultados contradictorios.

-Ansiedad e hiperactividad: para evaluar estos parámetros en ratones *Fmr1* KO se han realizado distintos experimentos como el ensayo de “luz-oscuridad” en el que se evalúa el interés del animal por explorar un área nueva que está iluminada. En principio, un ratón que no presente ansiedad tenderá a evitar la zona iluminada, sin embargo, cuando el animal está ansioso realiza un mayor número de tránsitos entre las zonas oscura e iluminada. En esta prueba, hay estudios que indican que los ratones mutantes no muestran más ansiedad que los WT (Peier *et al.*, 2000; Veeraragavan *et al.*, 2012), aunque otros trabajos sí reflejaron un mayor número de transiciones en ratones *Fmr1* KO (Ding *et al.*, 2014). En el test de “campo abierto”, en el que se evalúa el tiempo que invierte el animal en explorar las áreas en las que se ha subdividido el campo, hay numerosos estudios que indican que los ratones carentes de FMRP manifiestan hiperactividad en comparación con animales WT tanto en individuos adultos (Restivo *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2014; Uutela *et al.*, 2014) como juveniles (Wrenn *et al.*, 2015). Los test de respuesta a estímulos acústicos como el de “inhibición prepulso”, consistente en la reducción del reflejo del sobresalto por un estímulo acústico mediante estimulaciones previas con estímulos sonoros de menor intensidad, o el de “reflejo del sobresalto acústico”, que mide la respuesta del animal ante un estímulo sonoro, han sido ampliamente empleados para evaluar la ansiedad e hiperactividad en ratones. Así hay trabajos que concluyen que los ratones *Fmr1* KO muestran una respuesta exacerbada que indica una clara hiperactividad (Chen & Toth, 2001; Nielsen *et al.*, 2002; Dolen *et al.*, 2007).

-Aprendizaje y memoria: tanto el test del laberinto acuático de Morris, en el que se evalúa la capacidad del ratón para recordar dónde se encuentra la plataforma dentro de una piscina de agua, como el de Barnes, con el que se mide la capacidad del animal para recordar dónde se encuentra el área de interés sirviéndose de diferentes estímulos visuales externos, muestran que los ratones *Fmr1* KO no tienen afectada la memoria espacial (Paradee *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2004). Sin embargo, hay otros trabajos que afirman que los ratones mutantes poseen una menor capacidad para retener información relativa a su entorno (1994; Kooy *et al.*, 1996). El test de “evitación pasiva”, en el que los animales aprenden a evitar una zona oscura en la que se les da un estímulo desagradable, ha sido empleado en varios estudios que indican que los ratones carentes de FMRP muestran un peor aprendizaje, así como una mayor tendencia a olvidar lo aprendido (Dolen *et al.*, 2007; Michalon *et al.*, 2012; Sare *et al.*, 2016; Sare *et al.*, 2017)

-Interacción social y comunicación: las pruebas de interacción social evalúan la interacción del animal con objetos u otros individuos, así como la preferencia que pueda tener por un objeto o un individuo ya conocido frente a uno novedoso. Para llevarlas a cabo se recurre a cámaras divididas en tres compartimentos comunicados, dejando al animal objeto de estudio en el compartimento central y al individuo/objeto con el que debe interactuar en uno de los compartimentos laterales dentro de un cilindro metálico para evaluar tanto el número de aproximaciones que realiza en animal que efectúa la prueba, como las formas de interacción (olisqueo, acicalado, etc.). Después se pone un individuo/objeto novedoso en el otro compartimento lateral y se evalúa el tiempo que invierte el animal en cada compartimento lateral para así saber si tiene preferencia por lo conocido o lo novedoso. Las pruebas realizadas en animales *Fmr1* KO muestran que, si bien el animal es capaz de interactuar normalmente con otro ratón, no muestra ninguna preferencia cuando está en presencia de un ratón nuevo y otro ya conocido o cuando está en presencia de un objeto nuevo y otro conocido, lo que contrasta con el comportamiento de los ratones WT, que muestran una clara preferencia por lo novedoso (Ventura *et al.*,

2004; Mines *et al.*, 2010; Bhattacharya *et al.*, 2012; Busquets-Garcia *et al.*, 2013). Esto podría deberse, bien a una falta de interés, o a una incapacidad del ratón para distinguir entre algo familiar o novedoso (Santos *et al.*, 2014). Asimismo, se han descrito alteraciones en la comunicación evaluadas mediante la medida de las vocalizaciones ultrasónicas (Rotschafer *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2014).

-Coordinación motora: aunque, en general, no se han descrito alteraciones en la función motora de los ratones *Fmr1* KO, hay estudios que muestran cambios en el equilibrio y la coordinación de los ratones mutantes evaluados mediante el “rotarod” y las “plataformas elevadas” (Roy *et al.*, 2011; Bhattacharya *et al.*, 2012). Asimismo, se ha descrito en ratones carentes de FMRP una alteración en el aprendizaje de habilidades motoras, evaluado mediante el test “forelimb-reaching task” (Padmashri *et al.*, 2013). En esta prueba se coloca al animal en una caja de plexiglás con una rendija por la que tendrá que introducir su pata delantera para alcanzar la comida y se cuantifica el número de intentos así como la cantidad de comida conseguida para evaluar tanto la coordinación motora, como el aprendizaje de habilidades motoras.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS:

Dado que la proteína FMRP regula los ARNm de al menos un tercio de las proteínas presinápticas, cabría esperar la existencia de alteraciones a nivel presináptico y por ello en este trabajo se ha planteado:

1. Conocer si la ausencia de la proteína FMRP altera la modulación de la liberación de glutamato mediada por los receptores CB1, β adrenérgicos y mGlu7 y si estos cambios afectan a la expresión y/o señalización de dichos receptores.

2. Determinar si la redistribución de las vesículas sinápticas inducida por los receptores presinápticos se altera en las sinapsis de los ratones *Fmr1* KO.

3. Determinar si la ausencia de la proteína FMRP afecta a formas de plasticidad presinápticas que requieran un aumento de la liberación de glutamato, como la LTP de las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje del cerebelo.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Materiales:

1.1. Material biológico.

Las preparaciones de sinaptosomas se elaboraron a partir de las cortezas cerebrales o de los cerebelos de ratones (*Mus musculus*) adultos de entre 2 y 6 meses de edad de ambos sexos. Se emplearon ratones de genotipo salvaje o wild type (WT) de la cepa C57BL/6J así como ratones carentes de la proteína FMRP (*Fmr1* KO) con el fondo genético C57BL/6J (*The Jackson Laboratory*).

Los animales fueron criados en el animalario de la Facultad de Medicina, así como en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid a partir de parejas reproductoras compradas a *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, Estados Unidos). La cría se hizo a partir de parejas formadas por individuos homocigotos o heterocigotos para la mutación *Fmr1*, por lo que se realizaron genotipados a partir de muestras de tejido de la oreja.

El manejo de los animales necesarios para la elaboración del presente trabajo fue realizado siguiendo las recomendaciones éticas para experimentación con animales y las regulaciones establecidas por la directiva del Consejo Europeo (86/609/EEC), aprobadas por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid y la Comunidad de Madrid.

1.2. Reactivos, medios y fármacos.

Los reactivos, medios y fármacos utilizados quedan recogidos en las siguientes tablas:

Tabla 3. Reactivos y materiales		
Reactivo/Material	Casa comercial	Referencia
Determinación de segundos mensajeros		
Kit cAMP dynamic 2 kit - 1,000 tests	Cisbio	62AM4PEB
Determinación de Calcio citosólico		
Fura 2-AM	Life Technologies	F1221
SDS	Bio-Rad	161-0302
Tris	Bio-Rad	161-0719
Genotipado		
Wizard SV Genomic Purification System	Promega	AC2361
dNTPs (PCR Nucleotide Mix 10mM)	Promega	C1141
Go Taq G2 FlexiPol, 5U/μL, 500U	Promega	M780B
oIMR ₂₀₆₀ 5'-CACGAGACTAGTGAGACGTG-3'	Sigma	-
oIMR ₆₇₃₄ 5'-TGTGATAGAATATGCAGCATGTGA-3'	Sigma	-
oIMR ₆₇₃₅ 5'-CTTCTG GCACCTCCAGCTT-3'	Sigma	-
Patrones de 100kb Real Escala 2	Real Laboratory	RBMM2
SYBR Safe 1000X	Invitrogen	S33102
Agarosa	Sigma	A9539
Proteinasa K	Promega	V3021
Inmunofluorescencia		
ProLong Gold Antifade reagent con DAPI	Life Technologies	P36935
Paraformaldehído	Sigma	158012-7
Suero de cabra (NGS)	Jackson ImmunoR	055-000-001
Suero de burro (NDS)	Jackson ImmunoR	017-000-121
Portaobjetos rectangulares 76x26x1mm	LineaLab	-
Cubreobjetos de 15mm	Thermo-Scientific	-
Alexa Fluor de burro 594 anti-Conejo	Invitrogen	A-21207
Alexa Fluor de burro 488 anti-Ratón	Invitrogen	A-21202
Alexa Fluor de cabra 594 anti-Cobaya	Invitrogen	A-11076
Alexa Fluor de burro 488 anti-Cabra	Invitrogen	A-11055
β1-adrenoreceptor Conejo (V-19)	Santa Cruz	sc-568
β1-adrenoreceptor Cabra	Sigma	SAB2500034
VGluT1 ratón	Synaptic Systems	135011

Tabla 3. Reactivos y materiales		
Reactivo/Material	Casa comercial	Referencia
Inmunofluorescencia		
VGluT2 ratón	Synaptic Systems	135421
Munc13-1 ratón	Synaptic Systems	126111
Munc13-2 conejo	Synaptic Systems	126203
Cannabinoid receptor type 1 Cobaya	Frontier Institute	CB1-GP-Af530
mGlu7a Conejo	Upstate Millipore	07-239
Sinaptofisina Ratón	Synaptic Systems	101011
Poli-L-lisina (MW 70k-150k)	Sigma	P4707
Liberación de glutamato		
Ionicina	Calbiochem	407942
Adenosina desaminasa (ADA)	Roche (Sigma)	10102105001
BSA (albúmina sérica bobina) libre de ácidos grasos	Sigma	A6003
Glutamato (ácido L-glutámico)	Sigma	G1626
EGTA	Sigma	E4378
Glutamato deshidrogenasa (GDH)	Sigma	G2626
NADP	Calbiochem	481972
Cloruro de calcio	Merck	1.02382.0500
Cloruro de potasio	Merck	1.04936.1000
Microscopía electrónica		
Glutaraldehído 25% Grado I	Sigma	G5882
OsO ₄	Electron Microscopy Sci	19172
K ₃ Fe(CN) ₆	Merk	1049840100
Kit SPURR embedding (Low Viscosity Medium)	TAAB	S024/D
Preparación de sinaptosomas		
Percoll	GE Healthcare	17-0891-02
EDTA	Merck	1.08418.0250
Sacarosa	VWR	27480.294

Tabla 4. Fármacos			
Fármaco	Casa comercial	Referencia	Efecto
8-pCPT	Biolog	C041	Activador específico de Epac
Forskolina	Calbiochem	344270	Activador de adenilato ciclasa
HU210	Tocris	0966/5	Agonista de receptor CB1
IBMX	Calbiochem	410957	Inhibidor de fosfodiesterasa de AMPc
Isoproterenol	Sigma	I6504	Agonista de receptores β adrenérgicos
L-AP4	Abcam	ab 120002	Agonista de receptor mGluR7
TTx	Abcam	120054	Bloqueante de canales de sodio
BAY 60-7550	Cayman Chemical	439083-90-6	Inhibidor específico de fosfodiesterasa 2
Picrotoxina	Abcam	ab120315	Bloqueante de receptores GABA A
LY-341495	Abcam	ab 120199	Antagonista de mGluRs de grupo II
Propranolol	Sigma	P8688	Antagonista de receptores β adrenérgicos
Rolipram	Abcam	ab120029	Inhibidor de fosfodiesterasa 4
DEANO	Abcam	ab145197	Donador de NO

Tabla 5. Medios

Medio	Composición
Estimulación kit cAMP	Tampón fosfato 50 mM, BSA 0,2 % (p/v), NaN ₃ 0,02 % (p/v) ; pH 7,0..
HBM	NaCl 140 mM, KCl 5 mM, NaHCO ₃ 5 mM, NaH ₂ PO ₄ 1,2 mM, MgCl ₂ 1 mM, D(+)-glucosa 10 mM, HEPES 10 mM; pH 7,4.
HBM - BSA	HBM con BSA libre de ácidos grasos 16 µM.
Lisis kit cAMP	HEPES 50 mM; KF 1 M, Triton X-100 1.25 % (v/v); pH 7.0.
Percolles	3, 10 y 23 % en sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM y DTT 0,25 mM, pH 7.4.
Reactivo Biuret	CuSO ₄ 1,6 % (p/v), KNaC ₄ H ₄ O ₆ (tartrato de sodio y potasio) 6,0 % (p/v), NaOH 3,0 % (p/v).
Sacarosa	Sacarosa 0,32 M pH 7.4
TAE 1X	Tris 40 mM, 20 mM acetato, 1 mM EDTA, pH 8,3.
TBS	Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,9 % (p/v), pH 7,4.
TBS con triton	TBS con triton X-100 al 0,2% v/v
Ringer	NaCl 119 mM, KCl 2,5 mM, MgSO ₄ 1,3 mM, CaCl ₂ 2,5 mM, NaHCO ₃ 26 mM, NaH ₂ PO ₄ 1 mM, glucosa 10 mM
Solución interna	Gluconato de cesio 122,5 mM, HEPES 10 mM, BAPTA 10 mM, Mg-ATP 2 mM, NaCl 8 mM, QX-314-Br 5 mM pH 7,3 ajustado con CsOH
Resina SPURR	ERLD 4221D 10g, DER 736 6g, NSA 26g, DMAE (S1) 0.4ml.
PB	Na ₂ HPO ₄ 0,1 mM pH 7,4

1.3. Equipos.

Los equipos empleados quedan recogidos en la siguiente tabla:

Tabla 6. Equipos	
Equipo	Casa comercial
Determinación de segundos mensajeros	
Lector de placas FLUOStar Omega	BMG LabTech
Electrofisiología	
Controlador de temperatura TC-324C	Warner Instruments
Estimulador S38	GRASS
Unidad de aislamiento ISU 165	Cibertec
Amplificador	PC-ONE
Cámara digital sight DS U3	Nikon
Digidata 1322A	Axon instruments
Microscopio directo eclipse fn1. Objetivos 10x y 40x	Nikon
Puller P-97	Sutter Instrument
Vibratomo Leica VT 1200S	Leica Biosystems
Genotipado	
Sistema electroforesis geles agarosa Hoefer miniVe	Pharmacia Biotech
Termociclador Mastercycler personal	Eppendorf
Fuente alimentación EPS 601	Amersham Pharmacia
Chips intradérmicos ID-100/162, Lector pocket LD560, Inyector IM-200	Trovan
Fluor S Multimager	BioRad
Inmunofluorescencia	
Microscopio Nikon Diaphot TE2000 con cámara CCD	Nikon/Hamamatsu
Hamamatsu C4880	Photonics
Lámpara de mercurio de alta presión HB-10101AF	Nikon
Objetivo de inmersión Nikon 100X	Nikon
Liberación de glutamato	
Fluorímetros LS-50B y LS-55	Perkin-Elmer
Baño termostatzado Digiterm 100	JP Selecta
Cubetas ST-9012	Starna
Microscopía electrónica	
Microscopio electrónico de transmisión JEM 1010	JEOL
Ultramicrotomo ultracut E	Leica

Tabla 6. Equipos	
Equipo	Casa comercial
Preparación de sinaptosomas	
Centrifuga preparativa RC-5B y RC-5C	Sorvall
Rotor SS-34	Sorvall
Rotor SM-24	Sorvall
Bomba peristáltica PumpDrive 5201	Heidolph
Homogeneizador Potter S	B. Braun
Otros	
Microfuga Biofuge pico (r=8.5cm)	Heraeus
Espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec III	Pegasus Scientific Inc.
Agitador magnético Agimatic-E	JP Selecta
Autoclave Autester ST Dry PV II	JP Selecta
pHmetro Basic20 con electrodo 5201	Crison
Equipos de agua destilada Elix y ultrapura Milli-Q A10	Millipore

2. Métodos:

2.1. Preparación de sinaptosomas.

Los sinaptosomas están constituidos por los botones sinápticos de los axones que se esciden y resellan espontáneamente durante el proceso de homogeneización del tejido cerebral y que pueden ser purificados mediante un gradiente de densidad (Dunkley *et al.*, 1986). Al microscopio electrónico, los sinaptosomas aparecen como sáculos citoplásmicos esféricos de tamaño variable (0,5-1,5 μ M) que contienen una o varias mitocondrias así como múltiples vesículas sinápticas. Los sinaptosomas constituyen un buen modelo para estudiar los fenómenos que tienen lugar a nivel presináptico, minimizando posibles interferencias postsinápticas. Esto, sumado a la conservación de la maquinaria proteica y de los mecanismos de transducción de señales, los convierten en un modelo adecuado para estudio de las vías de señalización mediadas por receptores presinápticos. Asimismo, los sinaptosomas poseen

una autonomía funcional como resultado de la presencia de mitocondrias en su interior capaces de realizar la glucólisis aeróbica durante varias horas (Kauppinen & Nicholls, 1986). Esta autonomía también engloba a su capacidad para realizar la captación, síntesis, almacenamiento y liberación de neurotransmisores (McMahon *et al.*, 1989; Nicholls, 1989b; a).

Los sinaptosomas se prepararon según la técnica previamente descrita (Dunkley *et al.*, 1986) (Figura 12). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y posterior decapitación. Los cerebros fueron extraídos y lavados en una solución de sacarosa 0,32 M pH 7,4 para, a continuación, realizar la disección de las cortezas cerebrales o de los cerebelos. Durante el sacrificio y disección de los ratones (3 por experimento para cortezas o 4 por experimento para cerebelos) las cortezas o los cerebelos se mantuvieron en sacarosa 0,32 M pH 7,4. A continuación se homogeneizaron realizando 3 pases completos a 700 rpm mediante el uso de un homogeneizador de vidrio modelo Potter con un vástago de teflón. El homogeneizado se centrifugó a 2000 g durante 2 minutos, recogándose el sobrenadante (S1a) y resuspendiendo el precipitado con sacarosa 0,32 M pH 7,4 para volver a centrifugarlo en idénticas condiciones (2000 g, 2 minutos) y aumentar así el rendimiento. Una vez recogido el segundo sobrenadante (S1b) ambos se centrifugaron a 9500 g durante 12 minutos. El precipitado (P1), que contenía núcleos y restos celulares, fue descartado.

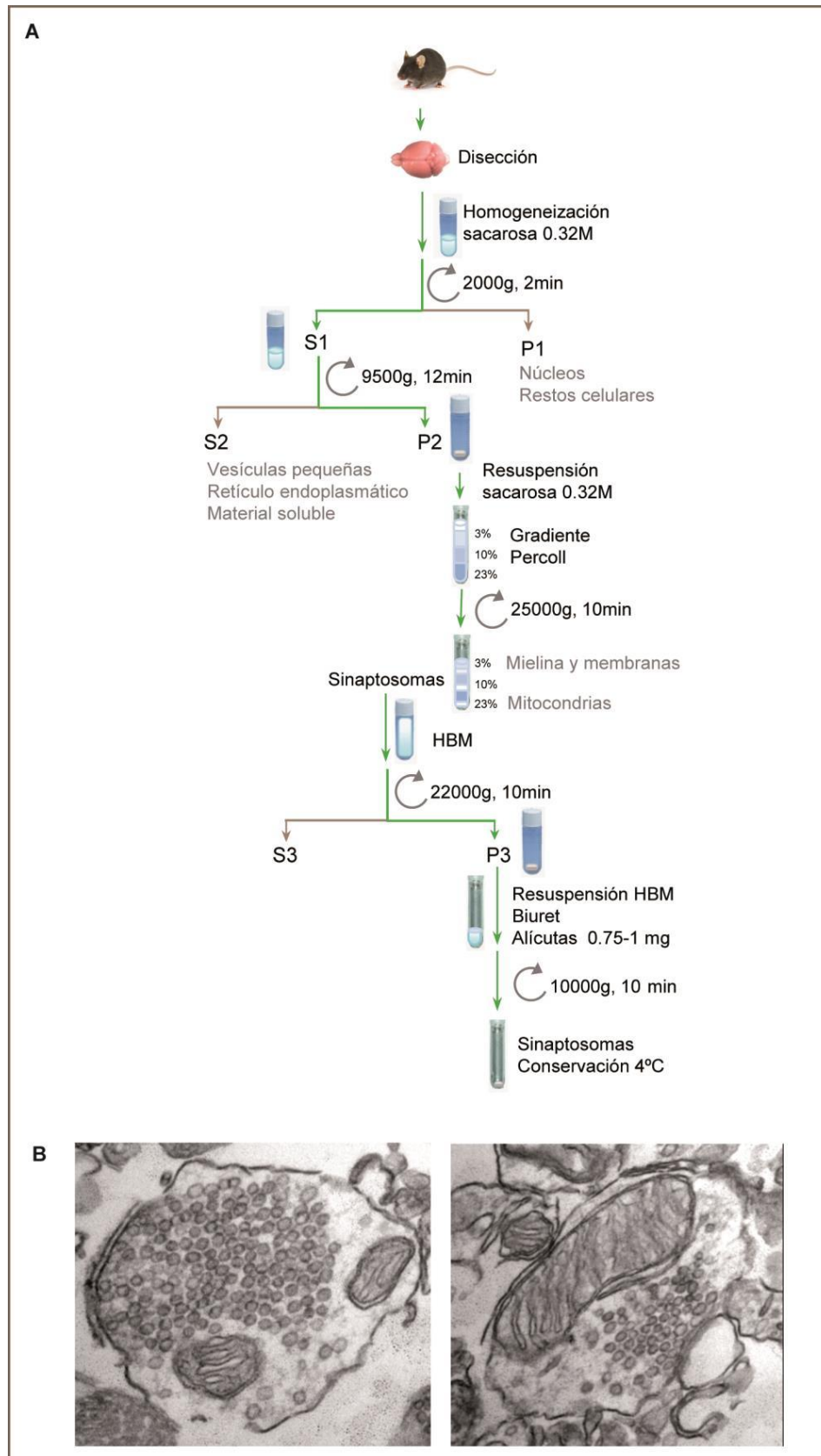


Figura 12. Preparación de sinaptosomas. (A) Esquema de obtención y purificación de sinaptosomas. (B) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de sinaptosomas purificados.

Seguidamente, los precipitados obtenidos (P2) fueron resuspendidos con sacarosa 0,32 M pH 7,4 de manera conjunta (aproximadamente 2 mL por precipitado para cortezas y 1 mL por precipitado para cerebelos) y depositados sobre dos gradientes discontinuos de concentraciones crecientes de Percoll de 3, 10 y 23%. Los sobrenadantes (S2), que contenían mayoritariamente vesículas pequeñas, retículo endoplásmico y material soluble, fueron descartados. Las distintas concentraciones de Percoll se prepararon en una mezcla de sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM y DTT 0,25 mM pH 7,4, empleándose aproximadamente 3mL de cada concentración para formar los gradientes mediante el uso de una bomba peristáltica. Los gradientes fueron centrifugados a 25000 g durante 10 minutos para, a continuación, recoger los sinaptosomas purificados situados en la interfase formada entre las bandas de Percoll del 10 y del 23%. El resto de las bandas, que contenían mielina y mitocondrias, fueron descartadas. Los sinaptosomas purificados fueron diluidos en HBM pH 7,4 hasta un volumen aproximado de 50 mL y centrifugados a 22000 g durante 10 minutos para eliminar los restos de Percoll. El sobrenadante (S3) se descartó y el precipitado (P3) se resuspendió en HBM pH 7,4 (0,5-1 mL). Para determinar la concentración de proteínas de esta resuspensión se recurrió al método de Biuret empleando un estándar interno de BSA (10 mg/mL). Posteriormente, esta resuspensión fue dividida en alícuotas de 0,75 mg de proteína que se diluyeron con 2 mL de HBM pH 7,4 y centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y los sinaptosomas se mantuvieron a 4°C durante un máximo de 4 horas. En ningún caso los sinaptosomas fueron congelados ni almacenados. Todos los medios y centrifugaciones se mantuvieron a 4°C y las muestras biológicas se preservaron en hielo.

2.2. Liberación de glutamato.

Los sinaptosomas, como ya se ha mencionado, poseen toda la maquinaria necesaria para liberar el neurotransmisor como consecuencia del acoplamiento de la despolarización de la membrana plasmática a la entrada de

calcio (Nicholls & Sihra, 1986). Sin embargo, al estar escindidos del resto de la neurona, no pueden recibir potenciales de acción a través del axón por lo que se requieren procedimientos químicos para inducir su despolarización.

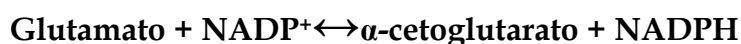
Uno de estos procedimientos se basa en el uso del K^+ puesto que los sinaptosomas se despolarizan en respuesta a un incremento en la concentración extracelular de este ion (Scott & Nicholls, 1980), con la consiguiente apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje (VDCCs) y la liberación del neurotransmisor (Tibbs *et al.*, 1989). La despolarización inducida por altas concentraciones de K^+ (30 mM), solo permite el estudio de las modulaciones dependientes de los VDCCs, pero no de los canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje dado que, como consecuencia del grado de despolarización que induce el K^+ , dichos canales se activan, pero se inactivan rápidamente, permaneciendo en el estado inactivado durante todo el experimento. Esta liberación es, por tanto, insensible a la acción del bloqueante de canales de sodio tetrodotoxina. Sin embargo, con concentraciones mas bajas de K^+ (5-10 mM) otros canales de activación transitoria participan en la modulación de la liberación de neurotransmisor ya que, a esta concentración de potasio, los canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje se recuperan de la inactivación pudiendo ser activados de nuevo. Así, la liberación de glutamato inducida por K^+ (5-10 mM) es sensible a tetrodotoxina.

La despolarización prolongada de los sinaptosomas conlleva una liberación de neurotransmisor que no es dependiente de Ca^{2+} ni de ATP y que se debe a la reversión de los transportadores de glutamato acoplados al gradiente electroquímico de Na^+ , de carácter electrogénico (Nicholls *et al.*, 1987; Sanchez-Prieto *et al.*, 1987). Por ello, es importante distinguir la liberación Ca^{2+} -independiente que ocurre tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} , de la exocitosis vesicular inducida por Ca^{2+} tras la despolarización (dependiente de Ca^{2+}).

Otra manera de inducir la exocitosis es mediante el uso del ionóforo ionomicina el cual se inserta en la membrana plasmática creando poros por los

que el Ca^{2+} puede acceder a la maquinaria exocitótica sin activación de los VDCCs (McMahon & Nicholls, 1991).

La determinación del glutamato liberado por los sinaptosomas se efectuó mediante la técnica previamente descrita (Nicholls *et al.*, 1987), basada en la reacción catalizada por el enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) en presencia de NADP^+ :



De esta manera, se puede monitorizar el incremento en la fluorescencia como consecuencia del aumento en los niveles de NADPH, en base a la señal fluorescente por excitación a 340 nm y su correspondiente emisión a 460 nm. La adición al final del ensayo de un estándar interno de glutamato, permite cuantificar el glutamato liberado por los sinaptosomas.

Los sinaptosomas obtenidos según la técnica previamente descrita y conservados a 4°C se resuspendieron en HBM-BSA pH 7,4, 37°C (0,67 mg/mL). Se mantuvieron en agitación a 37°C durante 30-60 minutos y se trataron con adenosina desaminasa (ADA, 1,7 U/mg 15 minutos), para eliminar la adenosina liberada por los sinaptosomas y evitar así la inhibición de la liberación del neurotransmisor por activación de los receptores A1 (Ladera *et al.*, 2007). De esta manera, se elimina la posible inhibición tónica inducida por la adenosina presente en el medio extracelular. Durante la incubación, los sinaptosomas fueron tratados con distintos fármacos según el experimento llevado a cabo. Tras finalizar la incubación, fueron centrifugados a 16000g durante un minuto para retirar los fármacos del medio. Después se resuspendieron en HBM o HBM-BSA pH 7,4, 37°C (0,67 mg/mL) según el caso, trasvasando 0,67mg a una cubeta de plástico de 1x1cm de base con agitador magnético que contenía NADP^+ 1 mM y Ca^{2+} 0,1-1,33 mM.

Para determinar la liberación Ca^{2+} -independiente inducida por la despolarización por K^+ , se sustituyó el CaCl_2 1,33 mM por una mezcla 1:2 de

CaCl₂/EGTA (1,9 mM/7,5 mM) que da lugar a una concentración final de Ca²⁺ de 200 nM

Para determinar la liberación espontánea, así como para trabajar con el ionóforo ionomicina, se incorporó a la cubeta tetrodotoxina (TTx) 1 μM, que es un bloqueante de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje.

La cubeta fue transferida a un fluorímetro Pelkin-Elmer LS55 con un sistema de agitación y termostatización a 37°C. A continuación se le añadieron 50 U de la enzima GDH y se incubó durante 2 minutos con agitación para eliminar el glutamato del medio. Transcurrido este tiempo, se realizó el registro de fluorescencia a 37°C durante 600 o 800 s empleado el programa FL WinLab en modo *Time Drive* con la siguiente configuración de parámetros: excitación 340±3 nm (filtro de emisión 390 nm), emisión 460±8,5nm, intervalo de obtención de datos 0,8s, ancho de respuesta 4,8s.

Durante el registro, se adicionaron distintos compuestos de acuerdo al experimento correspondiente (Figura 13). A los 100 s se indujo la entrada de Ca²⁺ y la subsiguiente liberación de glutamato mediante la adición de KCl 5 o 30 mM o de ionomicina (0,5-1 μM). Para determinar la liberación espontánea de glutamato, no se adicionó ningún compuesto que facilitase la entrada de Ca²⁺. Por último, se incorporó un estándar de glutamato (2 nmoles) 200 s antes del final del registro.

Para calcular la liberación Ca²⁺-dependiente inducida por KCl, se midió la liberación total (en presencia de CaCl₂ 1,33 mM), a la cual se restó la Ca²⁺-independiente (en presencia de EGTA con CaCl₂ 200 nM). La liberación inducida por los diferentes fármacos fue normalizada frente a la liberación Ca²⁺-dependiente inducida por KCl en ausencia de tratamiento.

En el caso de los experimentos en los que se empleó como estímulo la ionomicina, se restó a todos los ensayos la liberación espontanea en ausencia de ionomicina. La liberación inducida por los diferentes fármacos fue normalizada frente a la liberación inducida por ionomicina en ausencia de tratamiento.

La representación gráfica de los registros se llevó a cabo mediante el programa Origin 8.0 mientras que el tratamiento estadístico fue realizado con el programa SigmaPlot 11.0.

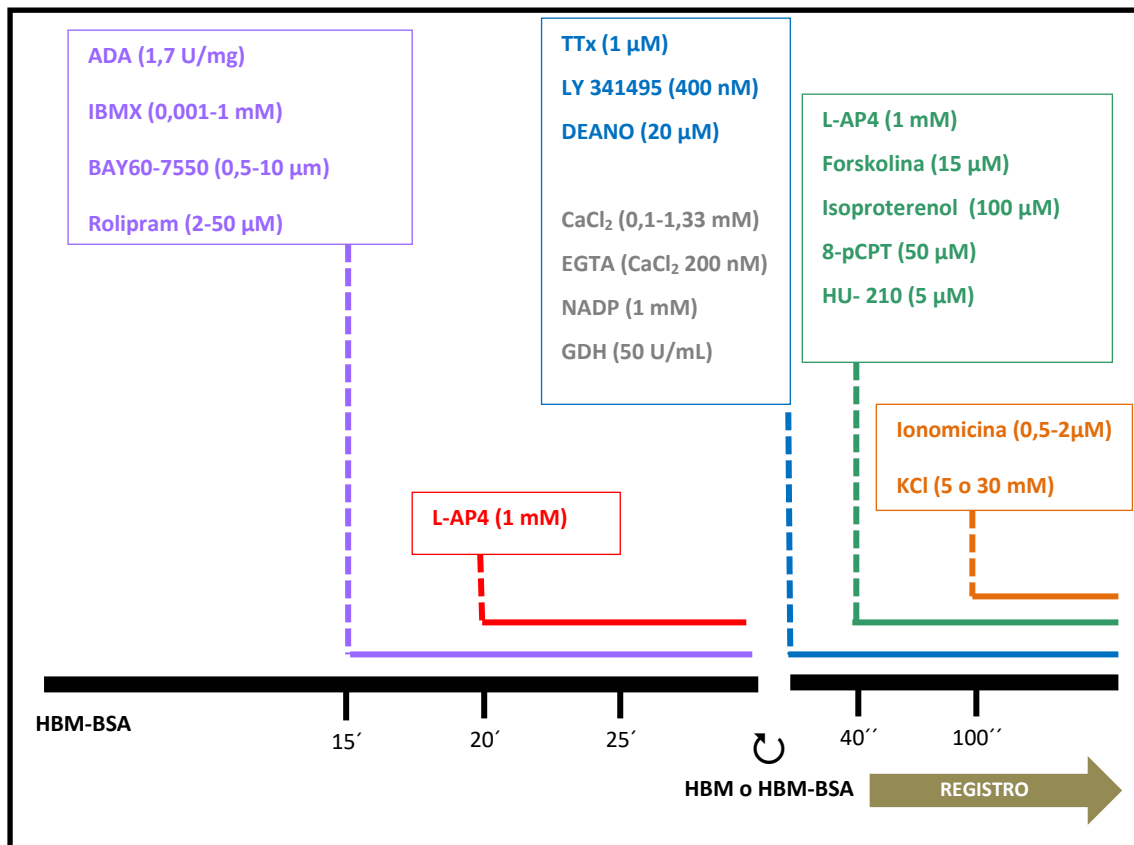


Figura 13. Liberación de glutamato. Esquema de los distintos compuestos y fármacos empleados antes y durante el registro de la liberación de glutamato por los sinaptosomas.

2.3. Determinación de los niveles de AMPc.

El AMPc es un segundo mensajero generado por la activación de la adenilato ciclasa. Se determinó el incremento de AMPc inducido por estimulación de los sinaptosomas con isoproterenol y con ionomicina. Para ello se empleó el kit comercial *cAMP Dynamic 2*.

Los sinaptosomas obtenidos de corteza o de cerebelo de ratón según el método descrito se resuspendieron en HBM-BSA (0,67 mg/mL) y se incubaron en agitación media hora a 37°C con el inhibidor de las fosfodiesterasas de

AMPC, IBMX (1 mM), durante 15 minutos. Luego fueron sometidos a los tratamientos farmacológicos correspondientes, es decir, isoproterenol (100 μ M, 10 minutos) y forskolina (15 μ M, 10 minutos).

A continuación se lavaron mediante una centrifugación a 16000 g durante 1 minuto y se resuspendieron a 3,41 mg/mL en tampón proporcionado por el kit y suplementado con IBMX (1 mM). Se transfirieron 5 μ L de dichas resuspensiones a una placa de 96 pocillos en la que previamente se había incorporado 45 μ L más del tampón suplementado con IBMX (1 mM) para conseguir una concentración final de 0,017 mg/mL. Asimismo, se destinaron una serie de pocillos a la determinación de la recta patrón mediante la incorporación de 25 μ L de unas diluciones seriadas de un patrón de AMPC a pocillos que previamente contenían 25 μ L del tampón suplementado con IBMX (1 mM). Además, se incluyeron pocillos sin patrón como blancos que contenían 50 μ L de tampón, así como dos pocillos sin el análogo de cAMP como controles negativos a los que se añadieron 25 μ L de tampón de lisis. Por último, se añadieron 25 μ L de las diluciones en tampón de lisis del análogo de cAMP-d2 y del anticuerpo anti cAMP-criptato.

Tras una hora de incubación a temperatura ambiente en oscuridad se procedió a la cuantificación de la fluorescencia mediante un lector de placas FluoStar Omega a 620 nm (donador) y 665 nm (aceptor). Con estos valores, se calculó la medida ratiométrica del valor de FRET (del inglés *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). A continuación, se calculó el incremento específico de FRET (ΔF), teniendo en cuenta el valor obtenido del blanco (Figura 14). Estos valores pueden ser ajustados matemáticamente, teniendo en cuenta el valor del máximo, a una relación lineal entre la ΔF y la concentración de AMPC. De esta manera, interpolando en la recta patrón de concentraciones conocidas, podemos calcular la concentración de AMPC de las muestras estudiadas, expresándola en pmol/mg. Los valores obtenidos se normalizaron respecto al control en ausencia de tratamiento.

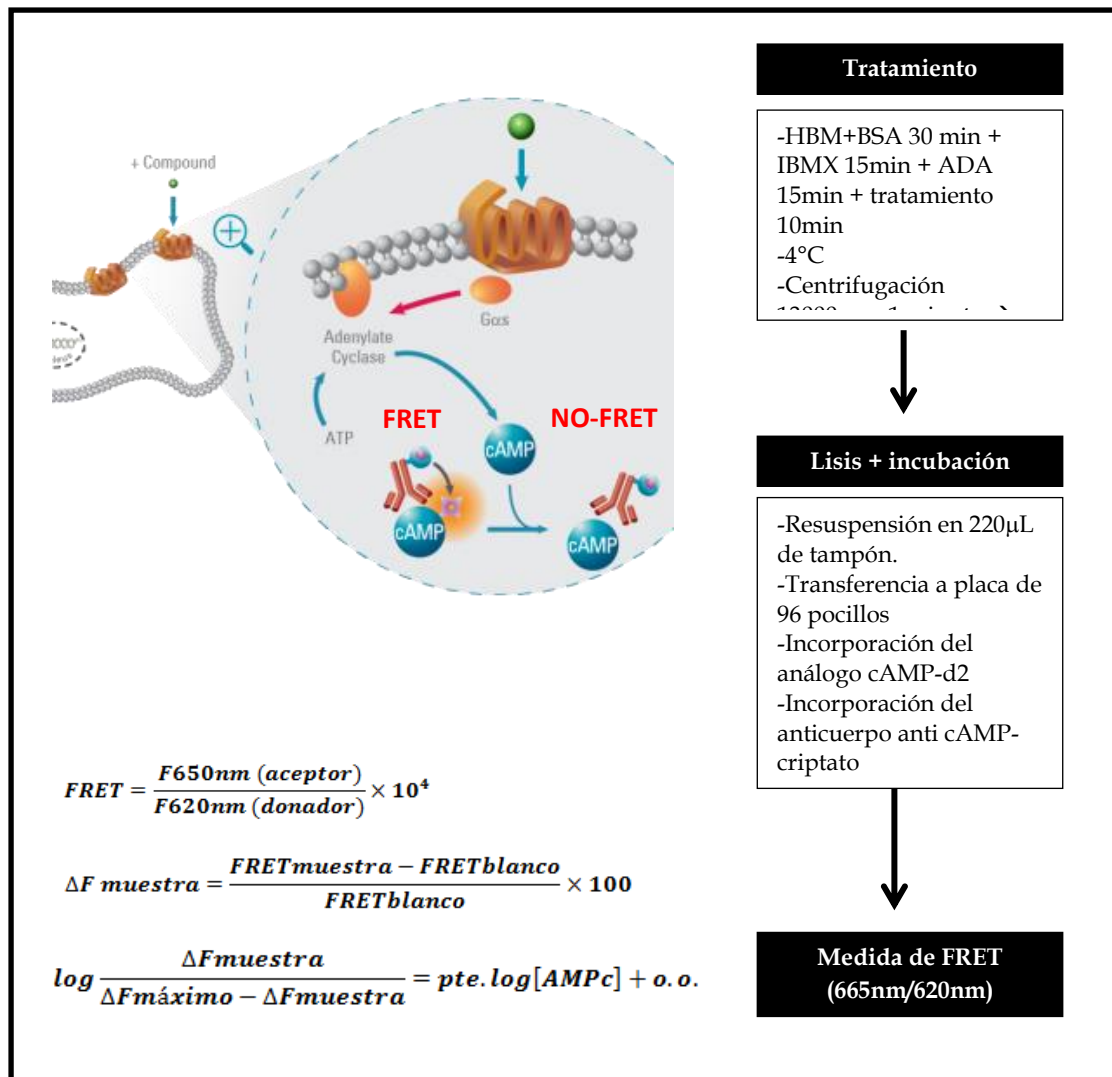


Figura 14. Determinación de los niveles de AMPc. Esquema del protocolo, fundamento y cálculos realizados para determinar los niveles de AMPc generados por los sinaptosomas.

2.4. Determinación de la concentración de calcio citosólico

Los niveles de calcio intracelular fueron medidos mediante el uso de la sonda fluorescente Fura-2 en sinaptosomas procedentes de corteza de ratones adultos. Esta sonda presenta la capacidad de unirse al calcio libre del interior celular. En este caso, se recurrió al empleo de un derivado de la misma, el fura-2-acetoximetilester (Fura-2AM) que tiene la capacidad de atravesar la membrana celular. Una vez en el interior de la célula, los grupos acetoximetilo son retirados por acción de las esterasas intracelulares liberándose el Fura-2.

Tras su obtención, los sinaptosomas se resuspendieron en HBM-BSA (1,5 mg/mL) y se incubaron con Fura-2AM 5 μ M y CaCl_2 1,3 mM durante 25 minutos. A continuación se centrifugaron a 16000 g durante 1 minuto y se resuspendieron en 1,1 mL de HBM (0,68 mg/mL). Una alícuota de 1 mL se transfirió a una cubeta que, a su vez, fue llevada a un fluorímetro Pelkin-Elmer LS55 con un sistema de agitación y termostatación a 37°C.

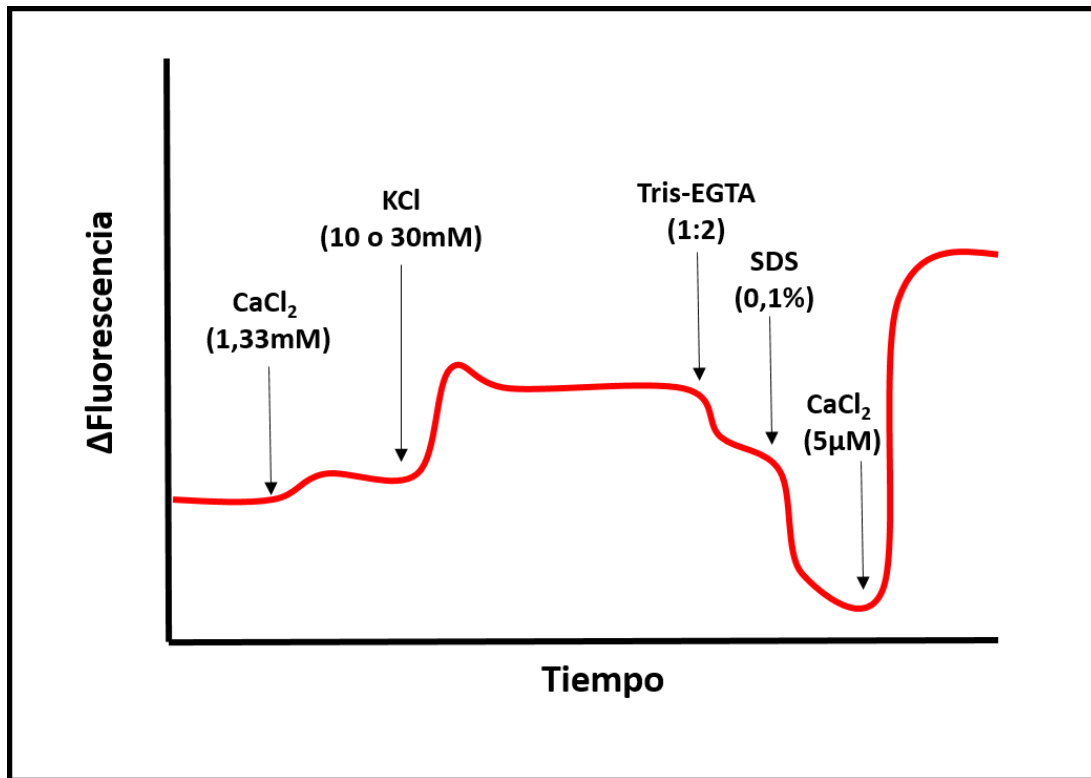


Figura 15. Determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con Fura-2AM. Se muestran los distintos compuestos que se incorporan a los sinaptosomas para llevar a cabo la determinación del calcio citosólico.

A continuación se procedió al registro de la fluorescencia en intervalos de 0,3 s a 340 y 510 nm (Figura 15). A los 40 s del inicio del registro se le añadió CaCl_2 1,3 mM y a los 110 s se añadió KCl (10 o 30 mM) para inducir una despolarización que permitiese la entrada de calcio al interior de los sinaptosomas. A los 250 s se incorporó una mezcla de Tris-EGTA (1:2) con el fin de quelar el calcio extracelular residual. Posteriormente, a los 300 s, se añadió SDS al 0,1% para lisar los sinaptosomas y obtener así la fluorescencia mínima al quelar también el Ca^{2+} intracelular. Por último, a los 350 s, se incorporó el

estándar de calcio (5 μ moles) a fin de obtener la fluorescencia máxima. Las concentraciones de calcio citosólico se calcularon mediante las ecuaciones descritas previamente (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

2.5. Inmunofluorescencia.

La técnica de inmunofluorescencia se aplicó a sinaptosomas procedentes de la corteza y cerebelo de ratones adultos y obtenidos según la técnica descrita en el apartado 2.1. Tras su obtención, los sinaptosomas se resuspendieron en sacarosa 0,32 M pH 7,4 (0,67 mg/mL) e incubaron durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se tomaron 54 μ g de la suspensión de sinaptosomas y se depositaron sobre cubreobjetos circulares de 15 mm de diámetro que previamente habían sido tratados con poli-L-lisina.

Tras una fijación de 45 minutos, el exceso de suspensión fue decantado y los sinaptosomas adheridos se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PB 0,1 M pH 7,4 durante 4 minutos. Seguidamente, se lavaron 2 veces con PB 0,1 M pH 7,4 durante 5 minutos y una vez con TBS 50 mM pH 7,4 durante 10 minutos. A continuación, se realizó el bloqueo con una solución al 10% de suero en TBS con triton X-100 al 0,2% durante 45 minutos. El paso siguiente fue la incubación con los anticuerpos primarios diluidos en una solución al 1% de suero con TBS con triton X-100 al 0,2% durante 12 horas. Los anticuerpos primarios usados en este trabajo fueron: anti-mGluR7 de conejo (1:250), anti-sinaptofisina de ratón (1:500), anti- β 1AR de conejo (1:200), anti- β 1AR de cabra (1:200), anti-Munc13-1 de ratón (1:500), anti-Munc13-2 de conejo (1:500), anti-VGluT1 de ratón (1:500), anti-VGluT2 de ratón (1:500) y anti-CB1 de cobaya (1:300). En todos los experimentos se efectuaron controles negativos a los que se les añadió únicamente la solución de dilución de los anticuerpos primarios.

Transcurridas las 12 horas, los sinaptosomas fueron lavados 3 veces con TBS 50 mM pH 7,4 durante 10 minutos y se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios Alexa fluor 488 y 594 de conejo, ratón, cabra y cobaya

diluidos (1:200) es una solución con suero al 1% en TBS 50mM pH 7.4 durante 1 hora y 20 minutos. Tras realizar tres lavados más con TBS 50mM pH 7,4, los cubreobjetos fueron montados con medio de montaje ProLong Gold antifade con DAPI. Se dejaron secar durante 1 hora en oscuridad y se almacenaron a 4°C.

La adquisición de imágenes se realizó secuencialmente para cada canal (488 y 594) mediante un microscopio Nikon Diaphot TE2000 con cámara CCD Hamamatsu C4880 con un objetivo 100X Nikon. Para la adquisición de las imágenes previamente se analizaron los controles negativos, los cuales, al estar incubados exclusivamente con el anticuerpo secundario pero no, el primario, únicamente muestran la señal inespecífica. A continuación se empleó el filtro necesario para suprimir dicha señal inespecífica y, en esas condiciones, fueron adquiridas todas las imágenes. Posteriormente las fotografías se procesaron con el programa ImageJ.

2.6. Genotipado.

Para analizar el ADN procedente de ratones carentes del gen *Fmr1* que codifica para la proteína FMRP se recurrió al kit comercial *Wizard SV Genomics ADN Purification System*. Los cruces se realizaron con individuos heterocigóticos adultos (mayores de 2 meses) disponiendo en cada jaula dos hembras y un macho. El genotipado de la progenie se realizó con muestras de tejido de la oreja. La muestra de tejido fue introducida en 275 µL de tampón de lisis de núcleos suplementado con EDTA 100 mM pH 8,0, RNAsa A 182 µg/mL y Proteinasa K 1,46 mg/mL durante 16-18 horas a 55°C con agitación suave a 300 rpm para su digestión. Después, las muestras se centrifugaron a 6000 g durante 5 minutos y se descartó el precipitado, añadiendo al sobrenadante 250 µL de tampón de lisis.

La mezcla fue transferida a unas microcolumnas de afinidad que retuvieron el ADN tras una centrifugación a 16000 g durante 5 minutos. A continuación se lavaron las columnas añadiendo una solución de lavado con

etanol al 60% y centrifugando a 16000 g durante 1 minuto. Este proceso se repitió 4 veces y se realizó una centrifugación más para eliminar cualquier resto de solución de lavado. Finalmente, para eluir el ADN, se añadieron 250 µL de agua estéril previamente calentada a 65°C que se mantuvo 2 minutos y se centrifugó a 16000 g durante 1 minuto. Los 250 µL volvieron a trasvasarse a la columna y se repitió el proceso anterior con el fin de aumentar el rendimiento. Tras la centrifugación a 16000 g durante 1 minuto se obtuvo el ADN purificado.

La amplificación de las muestras de ADN fue llevada a cabo mediante una PCR con la siguiente mezcla:

Compuesto	µL/muestra
ddH ₂ O	10,7
5X Go Taq buffer	4
MgCl ₂ 25 mM	1,6
dNTPs 10 mM	0,4
oIMR6735 10 µM	0,4
oIMR6734 10 µM	0,4
oIMR2060 10 µM	0,4
GoTaq Pol (5 U/µL)	0,1
ADN genómico	2

Los oligonucleótidos empleados fueron:

-oIMR ₂₀₆₀	CACGAGACTAGTGAGACGTG	<i>Mutant Forward</i>
-oIMR ₆₇₃₄	TGTGATAGAATATGCAGCATGTGA	<i>Wild type Forward</i>
-oIMR ₆₇₃₅	CTTCTG GCACCTCCAGCTT	<i>Common</i>

El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

94°C	2 min		
94°C	20 sec		10 ciclos
65°C	15 sec		
-0,5° C	per cycle decrease		
68°C	10 sec		
94°C	15 sec		
60°C	15 sec		28 ciclos
72°C	10 sec		
72°C	2 min		
10°C	hold		

Las secuencias de ADN amplificadas se separaron en geles de agarosa al 2% en tampón TAE con SYBR Safe y se revelaron con el equipo de imagen Fluor-S Multimager (Figura 16).

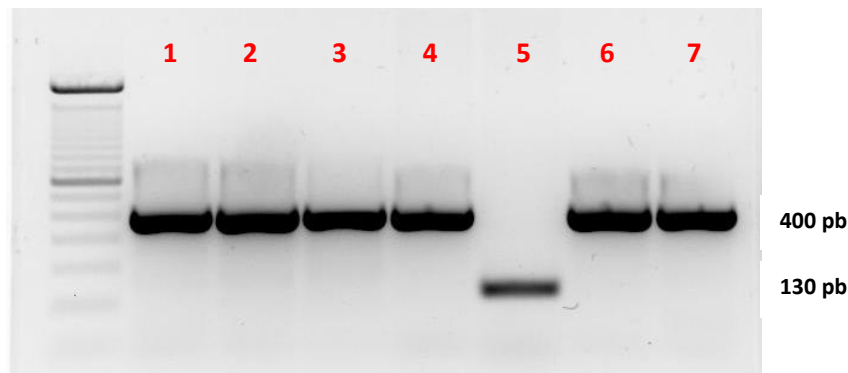


Figura 16. Genotipado. Las bandas correspondientes al mutante (1-4 y 6-7) aparecen a 400 pb, mientras que las del wild type (5) aparecen a 130 pb.

2.7. Microscopía electrónica de transmisión (MET).

La microscopía electrónica se basa en la emisión de un haz de electrones sobre una muestra, incrementando la capacidad de amplificación de un

microscopio óptico o de fluorescencia convencional, limitada a la longitud de onda de la luz. Existen diferentes técnicas de microscopía electrónica aplicables a muestras biológicas que permiten estudiar la ultraestructura de la sinapsis (Siksou *et al.*, 2009), pero la más comúnmente empleada es la fijación química combinada con la microscopía electrónica de transmisión.

En esta técnica, las muestras biológicas son fijadas empleando fijadores químicos para su preservación y posteriormente deshidratadas. Además, debido al bajo poder de penetración de los electrones, las muestras deben ser preparadas en secciones ultrafinas, para lo que deben ser incluidas en una resina. Dado que de forma natural las muestras biológicas no interaccionan con el haz de electrones, estas deben ser tratadas con metales pesados que se concentran en ciertas estructuras celulares, fundamentalmente membranas y complejos macromoleculares. Los electrones que impactan con estos metales rebotan y no atraviesan el tejido, mientras que los electrones transmitidos inciden sobre una pantalla fluorescente, creando la imagen de las muestras (Figura 17).

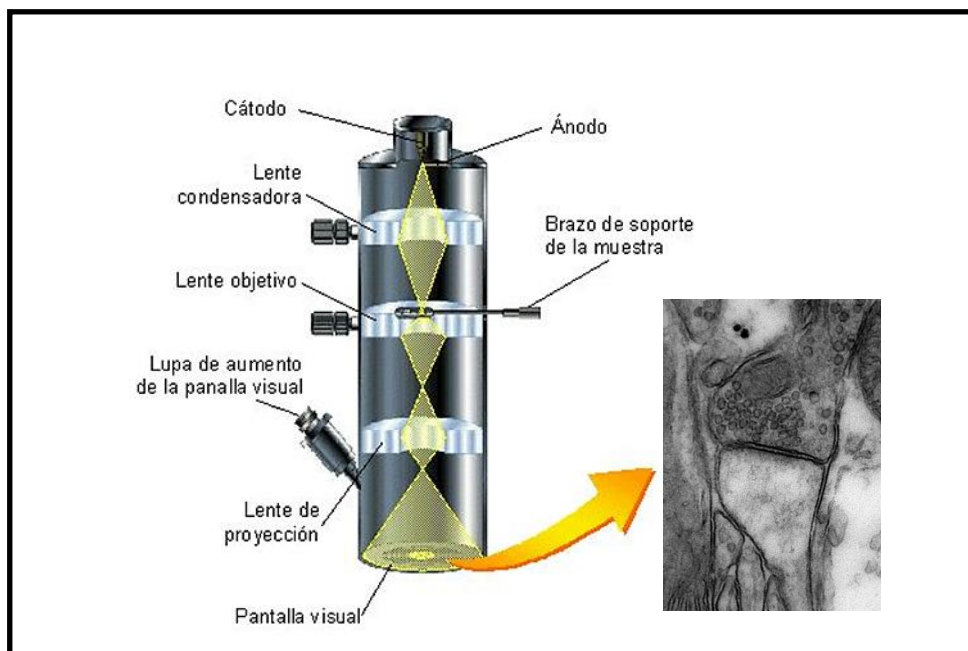


Figura 17. Microscopía electrónica de transmisión. Esquema de los elementos que componen un microscopio electrónico de transmisión e imagen de sinapsis obtenida mediante esta técnica.

Las muestras biológicas que se emplearon en este trabajo fueron rodajas de cerebro de corteza y cerebelo de ratones wild type y mutantes tratadas con distintos compuestos.

Las rodajas de 325 μm se obtuvieron mediante el empleo de un vibratomo y mantenidas durante 15 minutos en una cámara con perfusión de medio oxigenado. El tratamiento de isoproterenol se aplicó durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo fueron colocadas en una placa de 12 pocillos que contenía 1,5 mL de una solución de glutaraldehído al 3,5% a 37°C donde permanecieron durante 45 minutos. Después se transfirieron a otra placa de 12 pocillos con la misma cantidad de glutaraldehído al 3,5% a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, las placas se conservaron a 4°C hasta el día siguiente.

Después, el glutaraldehído fue retirado y las rodajas se lavaron 3 veces con medio PB 0,1 M a pH 7,4. Tras el lavado se procedió al tratamiento con una mezcla de OsO_4 al 1% con $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ al 1,5% durante 1 hora seguida de tres lavados con agua ultrapura. A continuación, se llevó a cabo la deshidratación de las rodajas mediante una serie de soluciones de etanol a distintas concentraciones (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y absoluto) durante 15 minutos cada una, repitiendo la solución de etanol absoluto una vez durante 15 minutos.

Seguidamente las rodajas se trataron con una mezcla de resina/etanol en distintas proporciones y tiempos, utilizándose la resina SPURR: 1:3 durante 1 hora, 1:1 durante 1 hora, 3:1 durante 2 horas y pura durante 12 horas. Al día siguiente las rodajas se colocaron en un molde de silicona con resina pura y se mantuvieron 72 horas a 70°C para su polimerización.

Los cortes ultrafinos y la obtención de imágenes se realizaron en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (Facultad de Químicas, Av. Complutense s/n, 28040 Ciudad Universitaria, Madrid). Las rodajas se cortaron en un ultramicrotomo Leica Ultracut E en secciones de 70 nm y se tiñeron con

acetato de uranilo y citrato de plomo. Se tomaron imágenes aleatorias de las sinapsis a 80.000 aumentos con un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1010, Tokyo, Japan). Las imágenes se analizaron con el programa Image J y los datos se procesaron usando Origin 8.0. Se midió la distancia desde el exterior de la membrana de cada SVs al interior de la membrana de la zona activa en la zona más cercana a la SV estudiada (0,72 nm/px a 80.000 aumentos). Las zonas activas se identificaron por la distribución de las SVs y por la presencia de restos de membrana postsináptica y la densidad postsináptica. La distribución de las SVs se determinó según su distancia a la zona activa, cuantificando el porcentaje de SVs en cada intervalo de 10 nm. Además, se determinó el número de SVs por cada zona activa.

2.8. Electrofisiología.

Las técnicas de electrofisiología de *whole cellpatch-clamp* permiten estudiar la corriente generada por el flujo de iones en una única célula, a través de la inserción de un electrodo en la membrana plasmática de la misma. La aplicación de estas técnicas en neuronas permite no sólo despolarizar las neuronas presinápticas, para inducir la liberación de neurotransmisores, sino también registrar la señal eléctrica provocada por el flujo de iones en la neurona postsináptica. Esto hace que estas técnicas constituyan uno de los procedimientos más ampliamente utilizados para el estudio funcional de la neurotransmisión en células vivas (Liem *et al.*, 1995).

Para los estudios de electrofisiología se emplearon rodajas parasagitales de cerebelo de 325 μm de grosor procedentes de ratones de 22-30 días que fueron anestesiados con isoflurano (1,5-2% en una mezcla de 80% aire artificial/20% oxígeno) y decapitados. Las rodajas se obtuvieron en medio Ringer muy frío con un vibratomo y se mantuvieron durante 1 hora en una cámara con medio Ringer en burbujeo con una mezcla de O_2 95%+ CO_2 5%. A

continuación se transfirieron a una cámara de perfusión para proceder al registro. El medio Ringer empleado en la cámara de perfusión se suplementó con picrotoxina 0,1 μM para bloquear los receptores GABA_A y se mantuvo con un burbujeo constante de O_2 95%+ CO_2 5%. El flujo fue de 1 mL/min y los registros se realizaron a 25°C gracias a un controlador de temperatura.

Para la estimulación se emplearon capilares con un ancho de punta de 2 a 5 μm llenos de solución Ringer conectados a un estimulador a través de una unidad de aislamiento que fueron situados en la capa molecular a fin de estimular las fibras paralelas que hacen sinapsis con las células de Purkinje (Figura 18). Los estímulos ($<0,5 \mu\text{A}$, 100 μs) fueron generados a 0,05 Hz con pares de pulsos separados 80 ms para obtener la relación de pares de pulsos (PPR) como EPSC2/EPSC1.

Los registros de las células de Purkinje se obtuvieron mediante un amplificador bajo condiciones de fijación de voltaje con el potencial de membrana fijado a -70 mV a fin de poder registrar las corrientes postsinápticas excitadoras evocadas (eEPSCs). Las pipetas de registro (3-4 $\text{m}\Omega$) se rellenaron de solución interna con un pH 7,3 y 290 mOsm de osmolaridad. Las resistencias de serie y de acceso se consideraron estables cuando, al restarles el potencial de membrana en reposo, no sufrieron un cambio mayor al 20%. Las células que no cumplieron este criterio fueron descartadas. Solo se analizó una neurona por rodaja.

Para medir las corrientes postsinápticas excitadoras miniatura (mEPSCs) se añadió TTx 1 μM al medio Ringer.

Para inducir la potenciación a largo plazo (LTP) se aplicó un tren tetánico de 100 estímulos a 10 Hz 15 minutos después del inicio del registro para permitir la difusión del BAPTA dentro del árbol dendrítico. La eEPSC basal fue menor de 300 pA para evitar las corrientes de sodio que pudiesen escapar de la fijación del voltaje durante y después de la tetanización.

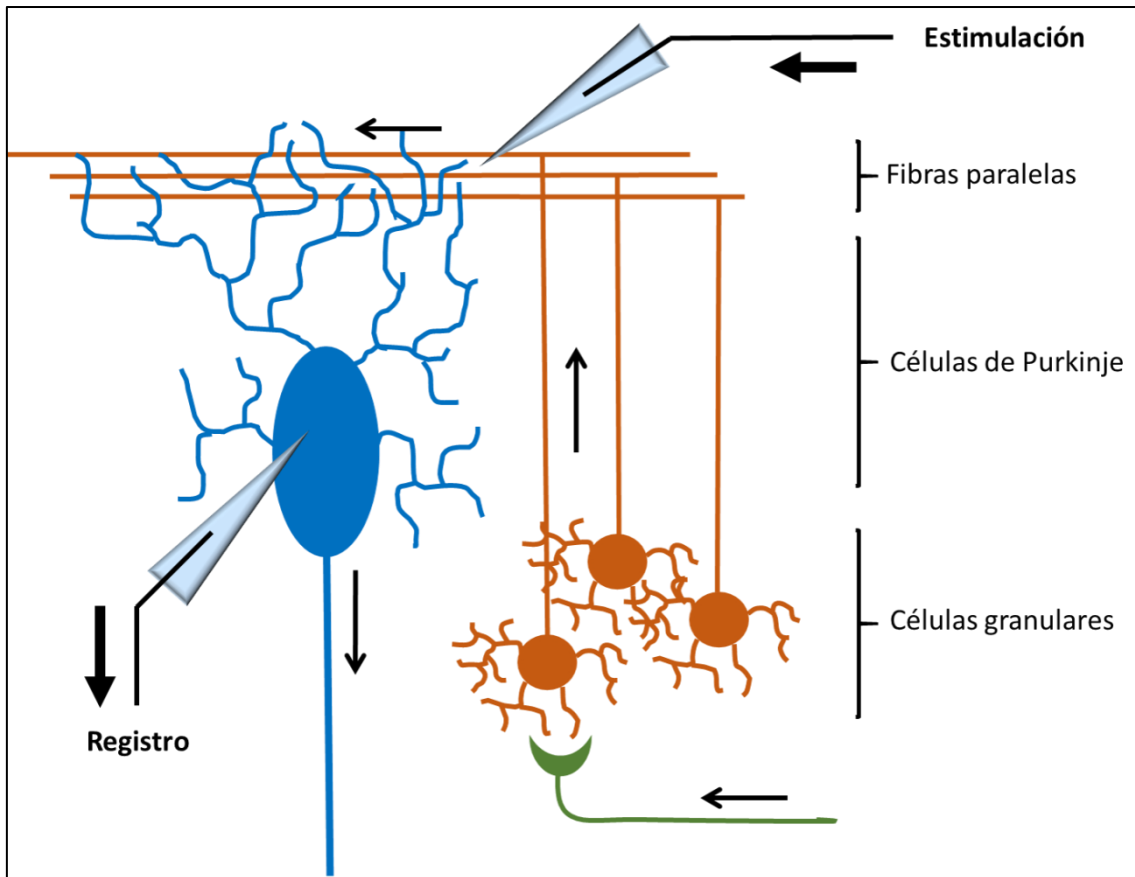


Figura 18. Electrofisiología de rodajas de cerebelo. La información procedente de corteza cerebral y médula espinal entra en el cerebelo a través de las fibras musgosas (verde) que establecen sinapsis con las células granulares (naranja). La información ascendente a través de las fibras paralelas y es recogida por las células de Purkinje (azul) que la llevarán hasta los núcleos profundos del cerebelo. En esta técnica se dispone de un electrodo de estimulación, que se coloca en la capa molecular para estimular las fibras paralelas, y uno de registro que se coloca sobre la célula de Purkinje.

Para calcular el RRP se ajustó la intensidad del estímulo previa a la LTP para obtener EPSCs con una amplitud de 150-200 pA. 30 minutos después de la aplicación o no aplicación (basal) del tren de 10 Hz para inducir la LTP presináptica, se empleó un tren tetánico de 100 estímulos a 40 Hz. La representación de las amplitudes acumuladas de las EPSC y la intersección de la parte más plana de la curva con el eje de ordenadas permitió estimar el tamaño del RRP. Cuando se estudió el efecto de la bajada del calcio extracelular sobre el RRP las rodajas se mantuvieron al menos 1 hora en un medio con bajo calcio. Después se incubaron durante 3 minutos con calcio 2,5 mM antes de aplicar el tren. Para la obtención de datos se empleó el software pClamp 10.3

mientras que la representación y el análisis se efectuó mediante el programa OriginLab 8.

2.9. Análisis y estadística.

Los experimentos de liberación de glutamato, determinación de los niveles de AMPc, determinación del calcio citosólico e inmunofluorescencia se llevaron a cabo, al menos, por triplicado empleando 3 ratones para corteza o 4 para cerebelo en cada experimento.

Los experimentos de microscopía electrónica se realizaron, al menos, por triplicado utilizando 1 ratón por experimento.

Los experimentos de electrofisiología se llevaron a cabo utilizando un mínimo de 4 ratones y, al menos, 9 células procedentes de 9 rodajas distintas en total.

Los test estadísticos empleados fueron la *t* de Student para aquellos experimentos en los que se compararon 2 grupos de datos y la ANOVA de una vía con el post-test de Bonferroni para los casos en los que se compararon 3 o más grupos de datos. En todos los casos se representaron los datos como la media \pm SEM (barras de error) y se estableció que existía significación estadística si el valor de $p < 0,05$.

El análisis estadístico se efectuó mediante el programa InStat GraphPad (2.05a). Los análisis de inmunofluorescencia y de distribución de vesículas se llevaron a cabo con el programa ImageJ (1.43m). Las gráficas se crearon con el programa Origin (8E) y las figuras y esquemas se diseñaron con el programa Adobe Illustrator CS3.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Inhibición de la liberación de glutamato por el receptor CB1.

Los receptores CB1 (apartado 1.3.2. de la introducción) son heteroreceptores que se acoplan a proteínas Gi/o, para inhibir la adenilato ciclasa (Howlett *et al.*, 1986) y la actividad de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, VDCCs, tanto del tipo N (Pan *et al.*, 1996; Szabo *et al.*, 2014), como del tipo P/Q (Twitchell *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2004), lo que, a su vez, resulta en la inhibición de la liberación de glutamato (Godino *et al.*, 2007).

En el FXS se han descrito alteraciones en la síntesis de endocannabinoides. Estos estudios señalan en unos casos un exceso de formación de estos compuestos (Maccarrone *et al.*, 2010; Zhang & Alger, 2010; Straiker *et al.*, 2013) y en otros un déficit (Jung *et al.*, 2012). No obstante, se desconoce si la ausencia de la proteína FMRP afecta a la funcionalidad de las vías de señalización del receptor en respuesta a un agonista exógeno, estimulación que excluiría cualquier alteración de la síntesis de endocannabinoides.

1.1. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la inhibición por receptores CB1 de la liberación de glutamato inducida por K⁺.

La liberación de neurotransmisor en la preparación de sinaptosomas requiere de un estímulo que induzca la despolarización de la membrana (Nicholls & Sihra, 1986). Esta despolarización puede ser provocada por un aumento de la concentración extracelular de potasio que va a reducir la salida de este ion del interior celular, y permitir la despolarización de la membrana. (Scott & Nicholls, 1980). Esta despolarización favorecerá la apertura de los canales de sodio sensibles a voltaje generando una despolarización de mayor magnitud que conducirá, en último término, a la apertura de los canales de Ca²⁺

dependientes de voltaje. No obstante, la contribución de los canales de Na^+ depende de la magnitud de la despolarización impuesta por el K^+ . A concentraciones altas de K^+ (30 mM) la magnitud de la despolarización impide la recuperación de los canales de Na^+ del estado inactivado, por lo que ni los canales de Na^+ ni los canales K^+ sensibles a voltaje contribuyen de manera significativa a la liberación de neurotransmisor en estas condiciones. Aunque estos canales se activarían inicialmente, se inactivarían rápidamente, permaneciendo en este estado durante los minutos restantes de la despolarización con KCl (Godino *et al.*, 2007). Por tanto, tras un estímulo con KCl 30 mM, la liberación de glutamato refleja la actividad y modulación de los canales de Ca^{2+} debido a que estos canales experimentan una menor inactivación por voltaje (Bean, 1989; Zamponi & Snutch, 1998)

El HU-210 es un cannabinoide sintético que se comporta como un agonista no específico de receptores cannabinoides. En condiciones normales los sinaptosomas se mantienen en incubación en un medio HBM suplementado con BSA libre de ácidos grasos, pero la naturaleza lipofílica del HU-210 puede favorecer su unión al BSA, por lo que en estos experimentos, tras la incubación de los sinaptosomas, se retiró el medio con BSA y fue sustituido por un medio HBM sin BSA (ver apartado 2.2. de “Material y métodos”).

En los sinaptosomas de corteza cerebral de ratones de genotipo salvaje la despolarización con KCl 30 mM indujo una liberación de glutamato dependiente de calcio de $3,88 \pm 0,16$ nmol/mg prot. ($n=12$). Esta liberación se redujo a $2,80 \pm 0,14$ nmol/mg prot. ($n=12$, $p<0,01$, ANOVA con Bonferroni, Figura 19A, C) en presencia del agonista cannabinoide HU-210 5 μM . En los sinaptosomas de ratones *Fmr1* KO, la liberación control aumentó ligeramente hasta $4,34 \pm 0,28$ nmol/mg prot. ($n=11$), aunque la diferencia con animales WT no fue significativa ($p>0,05$, ANOVA con Bonferroni). Además, en los sinaptosomas *Fmr1* KO, el agonista HU-210 5 μM redujo la liberación de glutamato en magnitud similar a la observada en los sinaptosomas WT ($3,18 \pm 0,18$ nmol/mg prot., $n=11$, $p<0,001$, ANOVA con Bonferroni, Figura 19B,

C). Por lo tanto, la ausencia de la proteína FMRP no altera la inhibición del agonista cannabinoide HU-210 en la liberación de glutamato inducida por KCl 30mM.

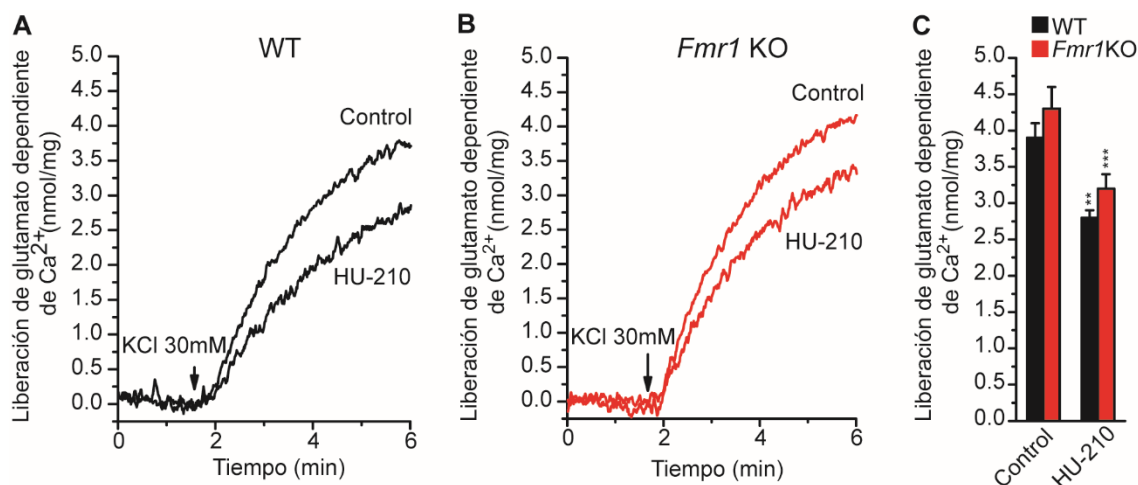


Figura 19. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la inhibición por receptores CB1 de la liberación de glutamato inducida por K⁺ 30 mM.

(A, B) Promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por KCl 30mM en sinaptosomas de corteza cerebral genotipo silvestre WT, (A) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del agonista cannabinoide HU-210 (5 μ M) añadido 1min antes que KCl. La liberación dependiente de Ca²⁺ es la diferencia entre la liberación obtenida en presencia de Ca²⁺ (1,33 mM) y en presencia de EGTA. (C) Diagrama que muestra el promedio de la liberación de glutamato en estas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). **p<0,01, ***p<0,001 (ANOVA con Bonferroni) comparados con los datos control.

Al contrario de lo que ocurre con la estimulación con KCl 30 mM, la menor magnitud de la despolarización impuesta por KCl 5 mM sí permite la recuperación de los canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de voltaje del estado inactivado (Godino *et al.*, 2007), por lo que estos canales pueden contribuir a la modulación de la liberación en estas condiciones. Esto explica la mayor inhibición de la liberación con KCl 5 mM ya que en estas condiciones otros mecanismos, como la activación de canales GIRKs (Ho *et al.*, 1999; Guo & Ikeda, 2004; Niswender *et al.*, 2008), se suman a la inhibición de los canales de Ca²⁺. Por ello se decidió llevar a cabo experimentos con el agonista cannabinoide en presencia de un estímulo de KCl 5 mM.

En los sinaptosomas cerebrocorticales de genotipo salvaje la despolarización con KCl 5 mM induce una liberación de $0,94 \pm 0,03$ nmol/mg prot, $n=17$, que fue inhibida por HU-210 5 μ M ($0,29 \pm 0,04$ nmol/mg prot., $n=17$, $p<0,001$, ANOVA con Bonferroni, Figura 20A, C). En sinaptosomas *Fmr1* KO la liberación de glutamato en ausencia y en presencia de HU-210 5 μ M fue ($0,85 \pm 0,08$ nmol/mg, $n=15$) y ($0,21 \pm 0,04$ nmol/mg, $n=15$, $p<0,001$, ANOVA con Bonferroni) respectivamente (Figura 20B, C). Por tanto, la ausencia de la proteína FMRP tampoco altera la inhibición por HU210 de la liberación de glutamato inducida por KCl 5 mM, si bien la mayor magnitud de la inhibición podría reflejar el reclutamiento de algún mecanismo adicional al de la modulación de la actividad de los canales de Ca^{2+} .

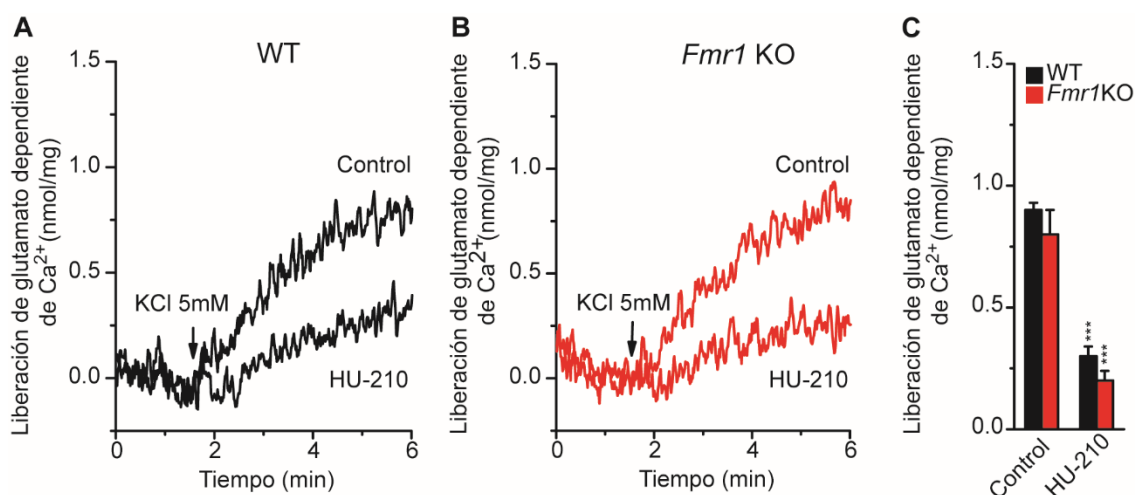


Figura 20. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la inhibición por receptores CB1 de la liberación de glutamato inducida K⁺ 5 mM.

(A, B) Promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por KCl 5 mM en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo control, WT, (A) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del agonista cannabinoide HU-210 (5 μ M) añadido 1min antes que KCl. La liberación dependiente de Ca^{2+} es la diferencia entre la liberación en presencia de Ca^{2+} (1,33 mM) y en presencia de EGTA. (C) Diagrama con el promedio de la liberación de glutamato en estas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p<0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con los datos control.

1.2. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la expresión del receptor CB1 en sinaptosomas cerebrocorticales.

Numerosos estudios han encontrado que el acoplamiento entre los receptores metabotrópicos de glutamato 1 y 5 y la síntesis del endocannabinoide 2-araquidonilglicerol (2-AG) está alterado en el ratón *Fmr1* KO (Maccarrone *et al.*, 2010; Zhang & Alger, 2010; Jung *et al.*, 2012; Straiker *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2015a; Qin *et al.*, 2015b; Tang & Alger, 2015). Nuestros datos indican que la inhibición de la liberación de glutamato con agonistas exógenos de los receptores de cannabinoides no está afectada en los sinaptosomas *Fmr1* KO, por lo que la ausencia de la proteína FMRP no parece modificar la expresión de estos receptores en los terminales sinápticos ni la señalización implicada en la inhibición de la liberación de neurotransmisor. No obstante, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia empleado anticuerpos contra el receptor CB1 y contra la proteína de las vesículas sinápticas sinaptofisina, utilizada como marcador de los botones sinápticos (ver apartado 2.5. de “Material y métodos”), para determinar posibles cambios en la expresión de estos receptores en los ratones *Fmr1* KO. La fracción de botones sinápticos WT inmunopositivos para el receptor CB1 ($45,3 \pm 1.9\%$, Figura 21A, C, 21 campos analizados) fue similar a la de los sinaptosomas *Fmr1* KO ($50,0 \pm 2.4\%$, Figura 21B, C, 21 campos analizados, $p=0,13$, t de Student). Por tanto, la ausencia de FMRP no afecta a la expresión del receptor CB1.

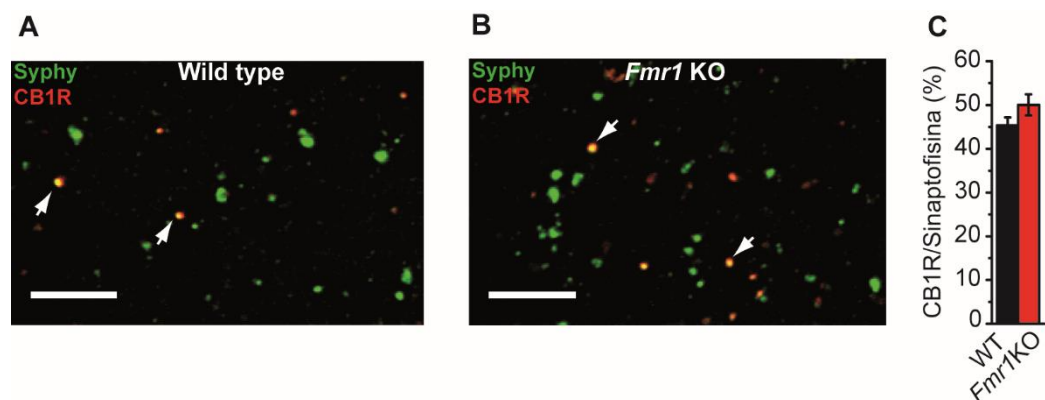


Figura 21. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la expresión del receptor CB1 en sinaptosomas cerebrocorticales

(A, B) Inmunofluorescencia de sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, (A) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), fijados en cubreobjetos polilisinados y teñidos con anticuerpos contra el receptor CB1 (1:300) y la proteína vesicular sinaptofisina (1:500). Barra de escala, 5 μ m. Las flechas indican terminales en los que hay colocalización. (C) Cuantificación de la expresión del receptor CB1 en sinaptosomas WT y *Fmr1* KO marcados con sinaptofisina. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). No significativo, $p > 0,05$ (*t* de Student) comparado con sinaptosomas WT.

2. Potenciación de la liberación de glutamato por los receptores β adrenérgicos.

Los receptores β adrenérgicos (β ARs) son heterorreceptores acoplados a proteínas Gs que se expresan en distintas áreas del SNC, incluyendo la corteza y el cerebelo (Nicholas *et al.*, 1996)(apartado 1.3.3. de la “Introducción”). La activación de estos receptores en la presinapsis conduce a un incremento en la actividad de la adenilato ciclasa con el consiguiente aumento de los niveles de AMPc, la activación de la PKA y la potenciación de la liberación de neurotransmisor. Más recientemente se ha observado que no todas las acciones potenciadoras de la liberación de neurotransmisor por los β ARs están mediadas por la PKA (Herrero & Sanchez-Prieto, 1996; Kaneko & Takahashi, 2004; Lee *et al.*, 2007), sino por la proteína Epac que ha surgido como un mediador alternativo de las acciones del AMPc en la presinapsis ((Herrero & Sanchez-Prieto, 1996; Kaneko & Takahashi, 2004; Lee *et al.*, 2007; Gekel & Neher, 2008; Ferrero *et al.*, 2013a; Zhao *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2015).

En el síndrome del X frágil se han descrito alteraciones en la vía del AMPc (Kelley *et al.*, 2007; Kelley *et al.*, 2008), generalmente por un déficit en su síntesis (Berry-Kravis & Huttenlocher, 1992; Berry-Kravis & Sklena, 1993; Berry-Kravis *et al.*, 1995; McBride *et al.*, 2005; Kanellopoulos *et al.*, 2012), que se revierte con la sobreexpresión de la proteína FMRP (Berry-Kravis & Ciurlionis, 1998), estableciéndose así la “teoría del AMPc del síndrome del X frágil” (Kelley *et al.*, 2008). Dado que la potenciación de la liberación de glutamato por los β ARs está mediada por un incremento en los niveles de AMPc (Millan *et al.*, 2002a) se procedió a averiguar si esta modulación de la liberación de glutamato podía estar alterada en los sinaptosomas *Fmr1* KO.

2.1. Potenciación por receptores β adrenérgicos en corteza cerebral.

2.1.1. La potenciación por el receptor β adrenérgico de la liberación de glutamato inducida por KCl 5mM se pierde en los sinaptosomas cerebrocorticales carentes de la proteína FMRP sin que existan cambios en la expresión del receptor o en su capacidad para inducir la síntesis de AMPc.

La potenciación por los β ARs de la liberación de glutamato presenta dos componentes: uno dependiente de PKA y otro independiente de esta quinasa, pero dependiente de proteínas Epac (Ferrero *et al.*, 2013a). Los experimentos de potenciación de la liberación exigen estímulos submáximos como los proporcionados por KCl 5 mM con el fin de no agotar las vesículas sinápticas y que quede margen para que se exprese el mecanismo de potenciación.

La estimulación de los sinaptosomas WT de corteza cerebral con KCl 5 mM indujo una liberación de glutamato de $1,45 \pm 0,12$ nmol/mg prot., $n=16$, que se incrementó hasta $(2,2 \pm 0,15 \text{ nmol/mg prot., } n=16, p < 0,001, \text{ ANOVA con Bonferroni, Figura 22A, C})$ tras la activación de los β ARs con isoproterenol 100 μ M. Sin embargo, en los ratones *Fmr1* KO la liberación inducida por KCl 5 mM ($1,56 \pm 0,05$ nmol/mg prot., $n=9$) no aumentó en presencia de isoproterenol 100 μ M ($1,45 \pm 0,08$ nmol/mg prot., $n=9, p > 0,05, \text{ ANOVA con Bonferroni, Figura$

22B, C). Por tanto, la ausencia de FMRP conlleva la pérdida de la potenciación de la liberación por los receptores β adrenérgicos.

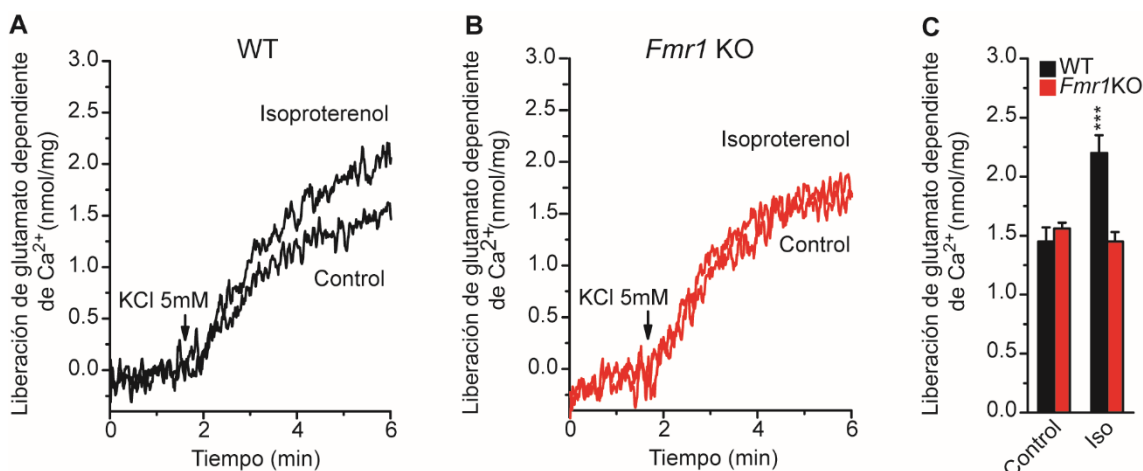


Figura 22. La potenciación por el receptor β adrenérgico de la liberación de glutamato inducida por K^+ 5 mM se pierde en los sinaptosomas cerebrocorticales carentes de la proteína FMRP.

(A, B) promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por KCl 5 mM en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, (A) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del agonista β adrenérgico isoproterenol (100 μ M) añadido 1min antes que KCl. La liberación dependiente de Ca^{2+} se determinó como la diferencia entre la liberación en presencia de Ca^{2+} (1,33 mM) y en presencia de EGTA. (C) Diagrama que muestra el promedio de la liberación de glutamato en estas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p < 0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control.

Si bien no se ha descrito que la proteína FMRP interaccione con el ARNm de los receptores β adrenérgicos, sí lo hace con el ARNm de la kinasa de estos receptores (Darnell *et al.*, 2011) por lo que los niveles de receptor en los terminales sinápticos *Fmr1* KO podrían estar alterados. Por ello, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia con anticuerpos contra el receptor $\beta 1$ adrenérgico y contra la proteína vesicular sinaptofisina. Los resultados mostraron que el receptor se expresa en el $38,4 \pm 2,0\%$ de los sinaptosomas procedentes de ratones WT (23 campos analizados, Figura 23A, C) y en el $39,6 \pm 1,5\%$ de los sinaptosomas de animales *Fmr1* KO (25 campos analizados, $p = 0,64$, *t* de Student, Figura 22B, C). Por tanto, la ausencia de la proteína FMRP

no altera la expresión del receptor $\beta 1$ adrenérgico en el conjunto de la población de terminales sinápticos.

Asimismo, se caracterizó la expresión del receptor en la subpoblación de terminales glutamatérgicos mediante el uso de anticuerpos frente a los transportadores vesiculares de glutamato vGluT1 y vGluT2. Los resultados indican que no existen diferencias entre animales WT ($20,52 \pm 2,01\%$, 15 campos analizados, Figura 23D, F y $18,76 \pm 2,09\%$, 9 campos analizados, Figura 23G, I) y *Fmr1* KO ($20,51 \pm 2,26\%$, 13 campos analizados, $p=0,9974$, *t* de Student, Figura 23E, F y $24,42 \pm 4,07\%$, 11 campos analizados, $p=0,2629$, *t* de Student, Figura 23H, I) para vGluT1 y vGluT2 respectivamente.

Por tanto, la ausencia de la proteína FMRP no altera la expresión de los β ARs en los botones sinápticos glutamatérgicos por lo que la pérdida de la potenciación de la liberación de glutamato podría deberse a cambios en la señalización de estos receptores.

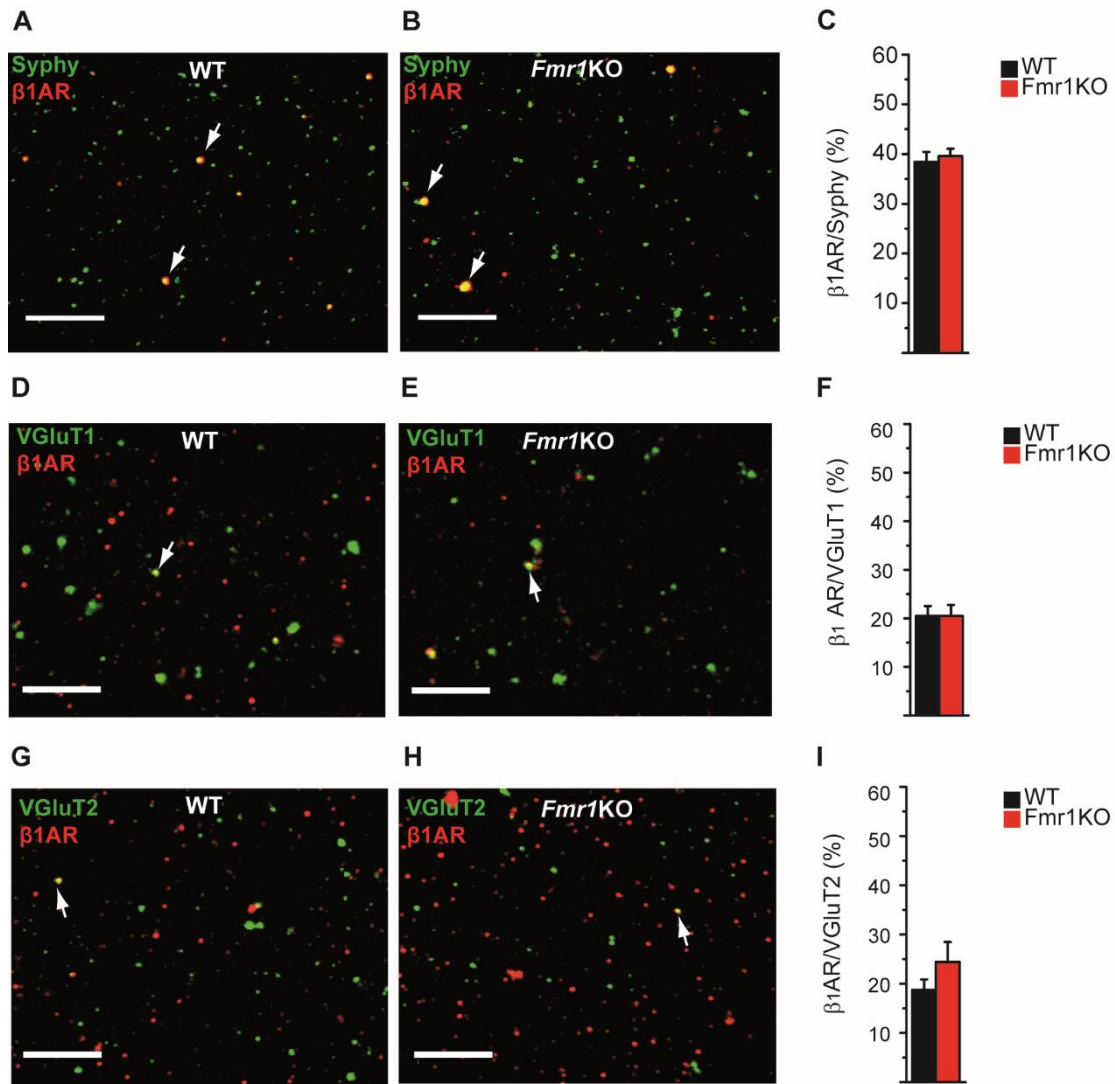


Figura 23. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la expresión del receptor $\beta 1$ adrenérgico.

Inmunofluorescencia de sinaptosomas de genotipo salvaje, WT, (A, D, G) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B, E, H), fijados en cubreobjetos polilisinados y teñidos con anticuerpos contra el receptor $\beta 1$ adrenérgico (1:200) y la proteína vesicular sinaptofisina (1:500) (A, B), contra el receptor $\beta 1$ adrenérgico (1:200) y el transportador de glutamato vGluT1 (1:500) (D, E) y contra el receptor $\beta 1$ adrenérgico (1:200) y el transportador de glutamato vGluT2 (1:500) (G, H). Barra de escala, 5 μ m. Las flechas indican terminales donde existe colocalización. (C, F, I) Cuantificación de la expresión de $\beta 1$ AR en sinaptosomas WT y *Fmr1* KO marcados con sinaptofisina (C), vGluT1 (F) y vGluT2 (I). Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). No significativo, $p > 0,05$ (t de Student) comparado con sinaptosomas WT.

La proteína Munc13 desempeña un papel fundamental en la liberación de neurotransmisor (Rhee *et al.*, 2002; Rosenmund *et al.*, 2002), por lo que se decidió analizar la expresión de las isoformas Munc13-1 y Munc13-2, presentes en corteza, en los terminales sinápticos frente a sinaptofisina, obteniéndose resultados muy semejantes entre ratones WT ($47,58 \pm 5,49\%$, 9 campos analizados, Figura 24A, C y $47,7 \pm 5,85\%$, 9 campos analizados, Figura 24D,F) y *Fmr1* KO ($51,82 \pm 2,25\%$, 9 campos analizados, $p=0,485$, t de Student, Figura 24B, C y $42,56 \pm 3,44\%$, 9 campos analizados, $p=0,4702$, t de Student, Figura 24E, F) para Munc13-1 y Munc13-2 respectivamente. Sin embargo, en ausencia de FMRP, el receptor $\beta 1$ adrenérgico tiende a expresarse más en terminales sinápticos que contienen Munc13-2 ($11,54 \pm 1,01\%$, 26 campos analizados, Figura 24H, I y $28,95 \pm 3,45\%$, 14 campos analizados, Figura 24K, L) en comparación con animales WT ($14 \pm 1,07\%$, 15 campos analizados, $p=0,123$, t de Student, Figura 24G, I y $18,77 \pm 2,27\%$, 14 campos analizados, $p=0,0189$, t de Student, Figura 24J, L) para Munc13-1 y Munc13-2 respectivamente. Dado que la isoforma Munc13-2, junto con las isoformas Munc13-1 y Munc13-3, también está implicada en la potenciación de la liberación de neurotransmisor (Rosenmund *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2018), es poco probable que la falta de potenciación de la liberación de glutamato por los β ARs de los sinaptosomas *Fmr1* KO sea debida al enriquecimiento relativo de estos receptores en botones sinápticos que contienen Munc13-2.

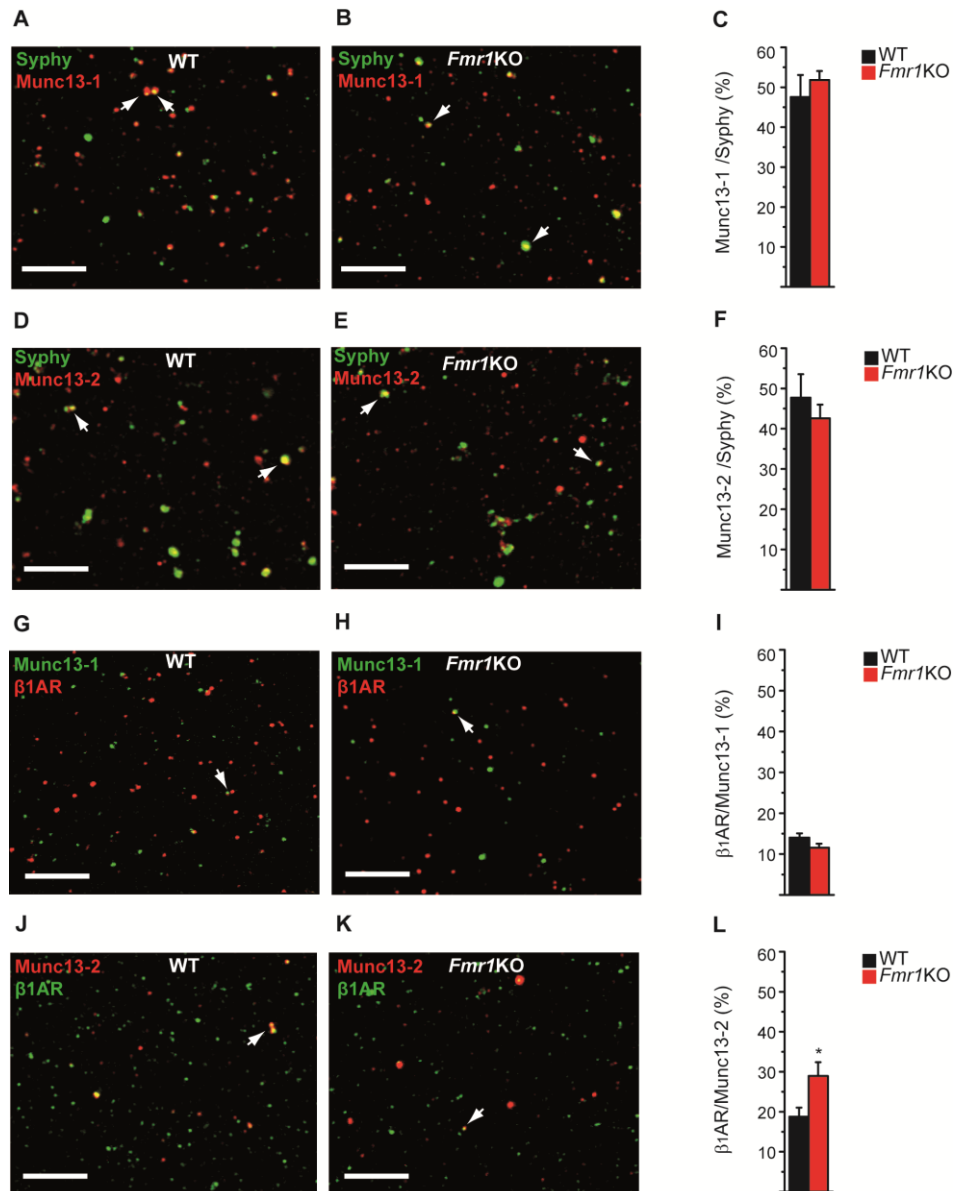


Figura 24. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la expresión de las isoformas de Munc13, aunque sí a la coexpresión de β 1AR con Munc13-2.

Inmunofluorescencia de sinaptosomas de genotipo salvaje, WT, (A, D, G, J) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B, E, H, K), fijados en cubreobjetos polilisinados y teñidos con anticuerpos contra la proteína de la zona activa Munc13-1 (1:500) y la proteína vesicular sinaptofisina (1:500) (A, B), contra la proteína de la zona activa Munc13-2 (1:500) y la proteína vesicular sinaptofisina (1:500) (D, E), contra el receptor β 1 adrenérgico (1:200) y la proteína de la zona activa Munc13-1 (1:500) (G, H) y contra el receptor β 1 adrenérgico (1:200) y la proteína de la zona activa Munc13-2 (1:500) (J, K). Barra de escala, 5 μ m. Las flechas indican terminales donde hay colocalización. (C, F, I, L) Cuantificación de la expresión de Munc13-1 en sinaptosomas WT y *Fmr1* KO marcados con sinaptofisina (C), de Munc13-2 en sinaptosomas WT y *Fmr1* KO marcados con sinaptofisina (F) de β 1AR en sinaptosomas WT y *Fmr1* KO marcados con Munc13-1 (I) y de β 1AR en sinaptosomas WT y *Fmr1* KO marcados con Munc13-2 (L). Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). No significativo, $p > 0,05$, * $p < 0,05$ (t de Student) comparado con sinaptosomas WT.

Se planteó, entonces, la posibilidad de una alteración en el acoplamiento del receptor a la adenilato ciclasa y de un fallo en la generación de AMPc como la causa de la ausencia de potenciación por los β ARs. En este sentido se ha descrito que las plaquetas de pacientes de FXS tienen un déficit en la síntesis de AMPc por una posible alteración en la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa (Berry-Kravis & Huttenlocher, 1992). Así, se procedió a determinar los niveles de AMPc sintetizados por los sinaptosomas en presencia del agonista isoproterenol y del activador de adenilato ciclasa forskolina (ver apartado 2.3. de "Material y métodos"). El isoproterenol (100 μ M) incrementó los niveles basales de AMPc en un ($49,6 \pm 6,0\%$, $n=10$, $p>0,05$, ANOVA con Bonferroni) y en un ($47,4 \pm 5,0\%$, $n=8$, $p>0,05$, ANOVA con Bonferroni) en sinaptosomas WT y *Fmr1* KO, respectivamente (Figura 25). Por otro lado, el activador de la adenilato ciclasa forskolina 15 μ M elevó los niveles basales de AMPc en un ($230,7 \pm 41,0\%$, $n=8$, $p<0,001$, ANOVA con Bonferroni) y en un ($270,2 \pm 15,2\%$, $n=6$, $p<0,001$, ANOVA con Bonferroni) en las preparaciones WT y *Fmr1* KO, respectivamente (Figura 25). La comparación de los datos entre ambos fenotipos para isoproterenol ($p>0,05$, ANOVA con Bonferroni) y forskolina ($p>0,05$, ANOVA con Bonferroni) indica una respuesta similar y que, por tanto, la ausencia de potenciación de la liberación por los β ARs no se debe a una alteración en la generación de AMPc.

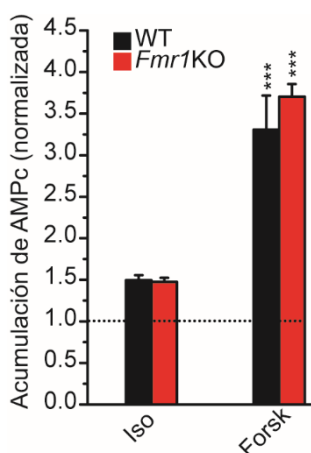


Figura 25. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la generación de AMPc inducida por el receptor β adrenérgico o por forskolina en sinaptosomas cerebrocorticales.

El isoproterenol (100 μ M, 10min) y la forskolina (15 μ M, 10min) se añadieron 5 min después de IBMX (15 min, 1 mM, ver "Materiales y métodos"). La acumulación de AMPc inducida se normalizó respecto de los valores basales de sinaptosomas cerebrocorticales sin tratar. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ (ANOVA con Bonferroni)

2.1.2. La potenciación por el activador de la adenilato ciclasa forskolina y por el activador de la proteína Epac 8-pCPT de la liberación de glutamato inducida por KCl 5 mM se pierde en los sinaptosomas carentes de la proteína FMRP.

La potenciación de la liberación dependiente de receptores β ARs se inicia con una señalización que incluye la generación de AMPc y la activación de proteínas Epac (Ferrero *et al.*, 2013a). Para descartar una pérdida de sensibilidad al AMPc de la maquinaria de señalización implicada en la potenciación en los terminales sinápticos *Fmr1* KO se empleó el activador de la adenilato ciclasa forskolina que proporciona una mayor elevación de AMPc que isoproterenol. Forskolina (15 μ M) incrementó la liberación de glutamato ($1,18 \pm 0,04$ nmol/mg prot., $n=10$ y $2,04 \pm 0,1$ nmol/mg prot., $n=10$, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni, Figura 26A, C) en ausencia y presencia de forskolina en sinaptosomas WT. Sin embargo, en sinaptosomas *Fmr1* KO la liberación inducida por KCl 5 mM ($1,16 \pm 0,14$ nmol/mg prot., $n=8$) no se incrementó en presencia de forskolina (15 μ M) ($1,14 \pm 0,14$ nmol/mg prot., $n=8$, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 26B, C). Por tanto, estos experimentos muestran que ni siquiera una mayor generación de AMPc potencia la liberación de glutamato en los sinaptosomas *Fmr1* KO y sugieren un fallo posterior a la activación de la adenilato ciclasa en ruta de señalización iniciada por los β ARs.

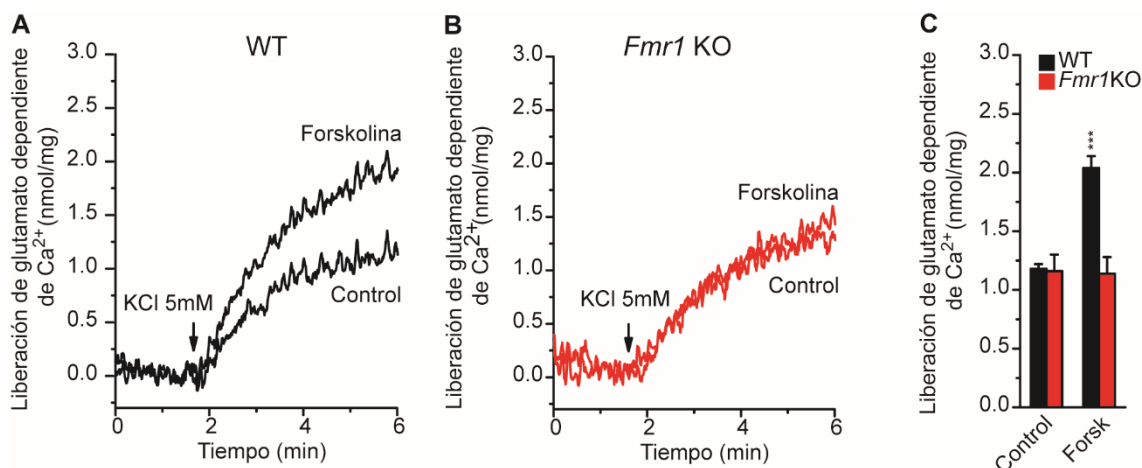


Figura 26. La potenciación por el activador de la adenilato ciclasa forskolina de la liberación de glutamato inducida por K^+ 5 mM se pierde en los sinaptosomas carentes de la proteína FMRP.

(A, B) promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por KCl 5 mM en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, (A) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del activador de la adenilato ciclasa forskolina (15 μM) añadido 1 min antes que KCl. La liberación dependiente de Ca^{2+} se determinó como la diferencia entre la liberación en presencia de Ca^{2+} (1,33 mM) y en presencia de EGTA. (C) Diagrama que muestra el promedio de la liberación de glutamato con forskolina 15 μM . Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). ***p<0,001 (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control.

Estudios previos del grupo han mostrado que la potenciación de la liberación de glutamato inducida por los βARs implica un componente independiente de PKA que depende a su vez de la activación de la proteína Epac. Además, la activación de las proteínas Epac incrementa la actividad de PLC, lo que se traduce en un aumento de los niveles de DAG, que favorecerá la traslocación de la proteína Munc13 e incrementará, en último término, el número de VSs colocadas en la membrana de la zona activa (Rhee *et al.*, 2002; Ferrero *et al.*, 2013a; Fernandes *et al.*, 2015).

Así, se procedió a activar la vía de señalización de los receptores βARs con 8-pCPT, un análogo sintético del AMPc, que activa específicamente las proteínas Epac (Enserink *et al.*, 2002). 8-pCPT (50 μM) incrementó los valores de liberación de glutamato ($1,14 \pm 0,07$ nmol/mg prot., n=5 y $1,86 \pm 0,09$ nmol/mg prot., n=7, p<0,001, ANOVA con Bonferroni, Figura 27A, C) en ausencia y

presencia de 8-pCPT en ratones WT. En cambio, en los sinaptosomas de ratones *Fmr1* KO 8-pCPT (50 μ M) no incrementó la liberación de glutamato, ($1,37 \pm 0,1$ nmol/mg prot., $n=5$) y ($1,24 \pm 0,05$ nmol/mg prot., $n=5$, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 27B, C) en ausencia y en presencia del activador, respectivamente. Estos resultados, junto con los anteriores, indican que ni isoproterenol, ni forskolina, ni 8-pCPT son capaces de poner en marcha la señalización que lleva a un aumento de la liberación de neurotransmisor en los terminales sinápticos carentes de FMRP.

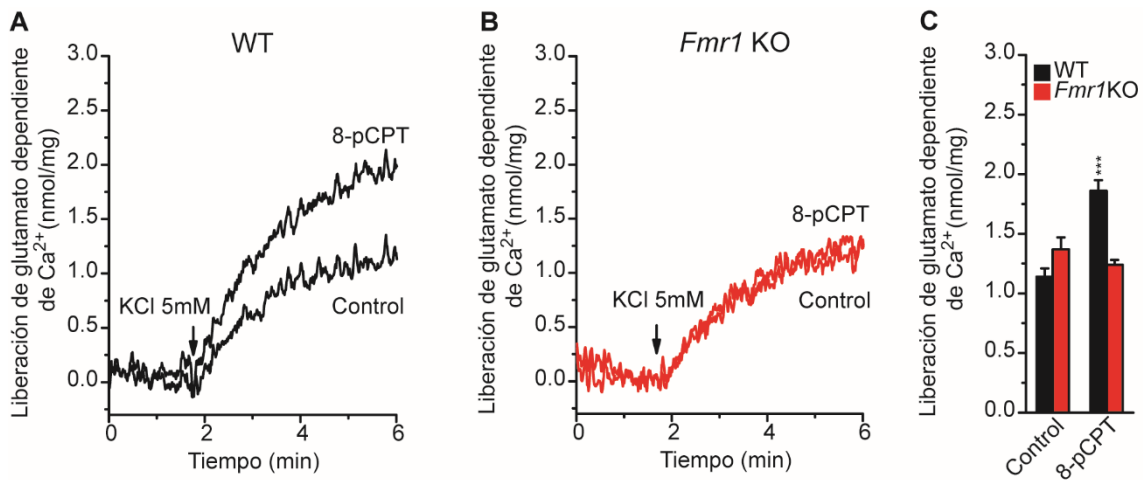


Figura 27. La potenciación por el activador de la proteína Epac 8-pCPT de la liberación de glutamato inducida por K^+ 5 mM se pierde en los sinaptosomas carentes de la proteína FMRP.

(A, B) Promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por KCl 5 mM en sinaptosomas de corteza cerebral genotipo silvestre, WT, (A), y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del activador 8-pCPT (50 μ M) añadido 1min antes que KCl. La liberación dependiente de Ca^{2+} se determinó como la diferencia entre la liberación en presencia de Ca^{2+} (1,33 mM) y en presencia de EGTA. (C) Diagrama que muestra el promedio de la liberación de glutamato en dichas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p < 0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control.

2.1.3. Las sinapsis corticales carentes de FMRP presentan mayor número de vesículas sinápticas en contacto con la membrana presináptica y el isoproterenol no aumenta este número.

La ausencia de potenciación de la liberación de neurotransmisor en terminales carentes de FMRP podría deberse a una alteración en la maquinaria exocitótica. En ratones *Fmr1* KO se ha observado una distribución alterada de

las VSs en el hipocampo que se traduce en un aumento del número de VSs colocadas en contacto con la membrana (*docked synaptic vesicles*) (Deng *et al.*, 2011b), cambio que podría explicarse por los mayores niveles de DAG de los ratones *Fmr1* KO (Tabet *et al.*, 2016a; Tabet *et al.*, 2016b). Dado que la potenciación de la liberación por los β ARs conlleva un aumento del número de vesículas amarradas a la membrana (Ferrero *et al.*, 2013a) podría pensarse en una posible oclusión de la potenciación en los ratones carentes de FMRP.

Para saber si la distribución de las VSs está alterada en la corteza cerebral de los animales *Fmr1* KO se realizaron experimentos de microscopía electrónica de transmisión en rodajas de corteza en condiciones basales y tratadas con isoproterenol (ver apartado 2.7. de “Material y métodos”) en las que se cuantificó la distribución de las VSs por su posición relativa respecto de la membrana presináptica en la zona activa. Las vesículas en contacto con la membrana de los animales WT ($2,4 \pm 0,1$ vesículas, $n=131$ sinapsis analizadas, 3 ratones, Figura 28A, C) aumentaron hasta ($4,6 \pm 0,2$ vesículas, $n=135$ sinapsis analizadas, 3 ratones, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni Figura 28B, C) tras el tratamiento con isoproterenol ($100 \mu\text{M}$, 10 min). En los ratones *Fmr1* KO se observó que basalmente tienen un mayor número de vesículas colocadas en la membrana de la zona activa ($4,2 \pm 0,2$ vesículas, $n=112$ sinapsis analizadas, 3 ratones, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni, Figura 28D, F) y que el isoproterenol no incrementó este número ($4,5 \pm 0,2$ vesículas, $n=124$ sinapsis analizadas, 3 ratones, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 28E, F).

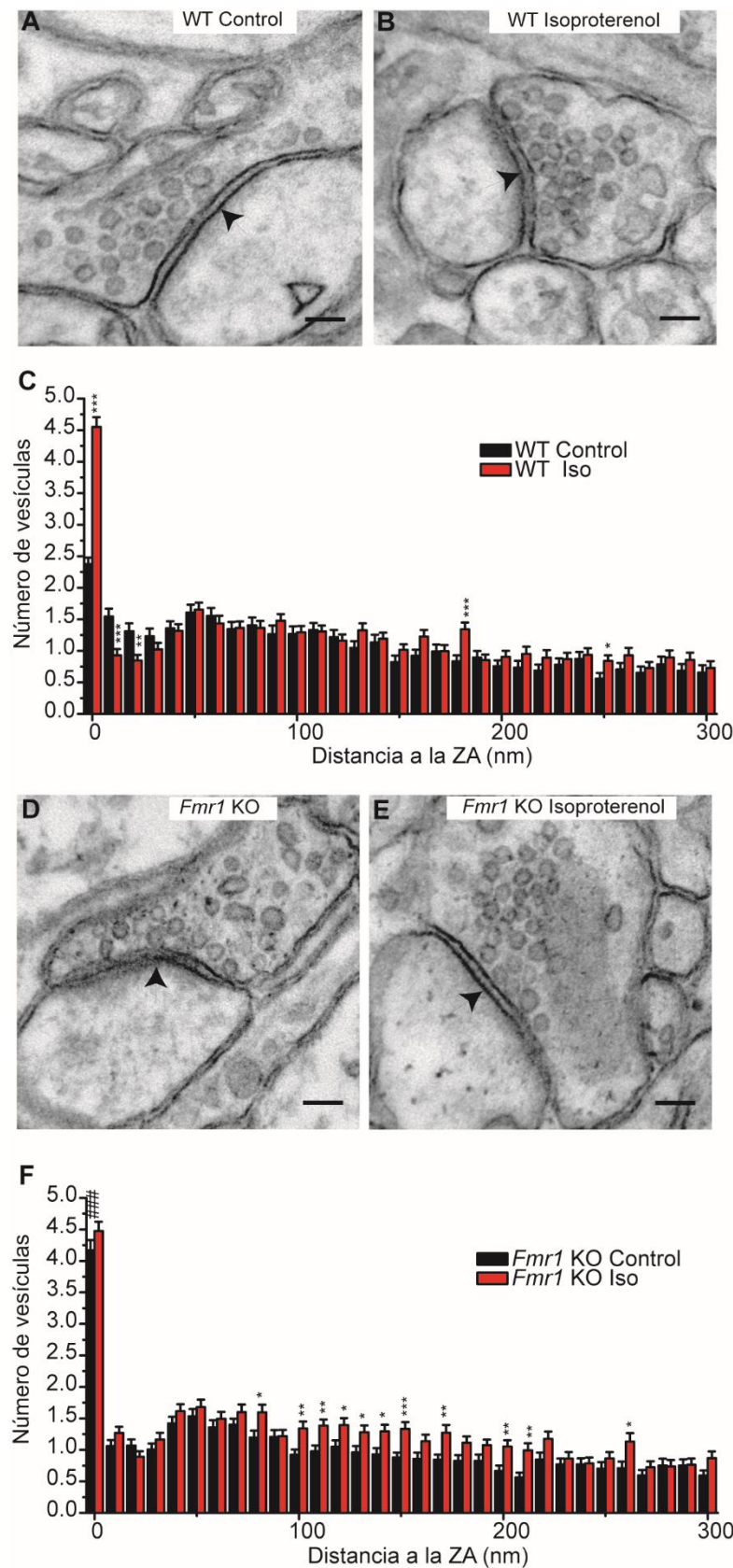


Figura 28. Las sinapsis corticales carentes de FMRP presentan mayor número de vesículas sinápticas en contacto con la membrana presináptica y el isoproterenol no aumenta este número.

(A, B, D, E) Micrografías electrónicas representativas de la distribución de vesículas en terminales sinápticos de las capas II/III de la corteza cerebral de animales de genotipo silvestre, WT, (A, B), y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (D, E), en condiciones basales (A, D) o tras el tratamiento con isoproterenol (100 μ M, 10 min) (B, E). Barra de escala 100 nm. (C, F) Cuantificación de la distribución de las VSs relativa a la distancia a la membrana de la zona activa (distribuidas en intervalos de 10nm) en las rodajas de animales WT (C) y *Fmr1* KO (F). Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (*t* de Student) cambios inducidos por isoproterenol comparados con datos obtenidos en rodajas control (sin tratar). ### $p < 0,001$ (ANOVA con Bonferroni) cambios en las VSs colocadas inducidos por la ausencia de FMRP.

Estos resultados sugieren que la incapacidad del isoproterenol para incrementar el número de vesículas colocadas en la membrana de la zona activa podría explicar la ausencia de potenciación de la liberación de glutamato de los sinaptosomas *Fmr1* KO.

2.1.4. La ausencia de FMRP incrementa la liberación espontánea de glutamato y ocluye la potenciación inducida por isoproterenol en sinaptosomas cerebrocorticales

El número de vesículas sinápticas colocadas en la membrana de la zona activa se corresponde con el RRP y, por tanto, con las vesículas sinápticas capacitadas para la fusión (Rosenmund & Stevens, 1996; Schikorski & Stevens, 2001). Dado que en animales *Fmr1* KO hay un mayor número de VSs colocadas en la zona activa, cabe esperar que esto tenga una repercusión en la liberación del neurotransmisor. Por ello, se procedió a estudiar la liberación espontánea de glutamato en sinaptosomas. Esta liberación se caracteriza por producirse en ausencia de estímulo como respuesta al calcio citosólico residual o a la apertura estocástica de canales de calcio (Ermolyuk *et al.*, 2013; Kaeser & Regehr, 2014).

Para minimizar la participación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, los experimentos se realizaron en presencia del bloqueante de canales de Na^{+} tetrodotoxina, que impide la despolarización de la membrana por apertura de estos canales. Los resultados mostraron que la liberación espontánea de glutamato en sinaptosomas WT ($1,54 \pm 0,07$ nmol/mg prot., $n=5$), aumentaba en presencia de isoproterenol (100 μM) ($2,05 \pm 0,06$ nmol/mg prot., $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni, $n=6$, Figura 29A, C). En los sinaptosomas *Fmr1* KO la liberación espontánea en ausencia de isoproterenol ($1,94 \pm 0,06$ nmol/mg prot., $n=5$) fue mayor ($p < 0,01$, ANOVA con Bonferroni) que en los sinaptosomas WT. Además, en los sinaptosomas *Fmr1* KO isoproterenol (100 μM) no incrementó la liberación espontánea ($2,01 \pm 0,08$ nmol/mg prot., $n=4$, $p > 0,05$, Figura 29B, C). Por tanto, parece que en los terminales sinápticos

carentes de la proteína FMRP la potenciación de la liberación espontánea por isoproterenol está ocluida.

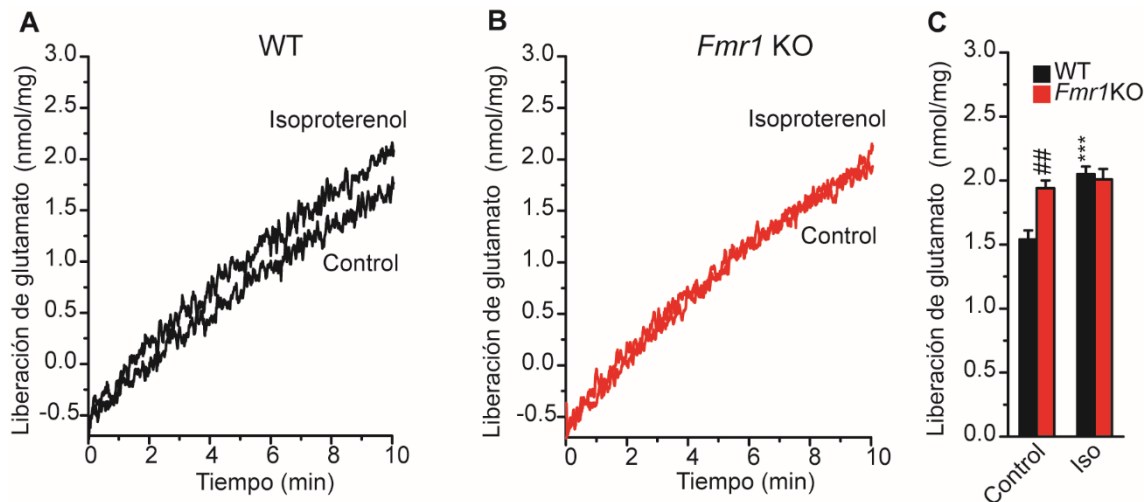


Figura 29. La ausencia de FMRP incrementa la liberación espontánea de glutamato y ocluye la potenciación inducida por isoproterenol en sinaptosomas cerebrocorticales carentes de la proteína FMRP.

(A, B) Promedio de registros de la liberación espontánea de glutamato en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, (A), y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del agonista del receptor β adrenérgico isoproterenol (100 μ M) añadido 100s después del inicio del registro. La liberación espontánea se determinó en medio con Ca^{2+} (1,33 mM) en ausencia de estimulación y en presencia del bloqueante de canales de Na^{+} TTx (1 μ M), añadido 2-3 min antes de empezar el registro. (C) Diagrama con el promedio de la liberación espontánea de glutamato en dichas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). ***p<0,001 (ANOVA con Bonferroni) comparado con datos control. ##p<0,01 (ANOVA con Bonferroni) comparado con animales de genotipo silvestre WT.

2.1.5. La ausencia de la proteína FMRP también lleva a la pérdida de la potenciación por receptores β adrenérgicos de la liberación de glutamato inducida con ionomicina

Aunque la liberación espontánea desveló la oclusión de la potenciación de la liberación de glutamato en ausencia de FMRP, la liberación inducida tiene mayor relevancia fisiológica, por lo que se recurrió a experimentos en los que la liberación de glutamato se estimuló con el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina.

Las sinapsis *Fmr1* KO tienen más vesículas en las proximidades de la membrana, pero el reclutamiento de VSs adicionales parece estar impedido, ya que isoproterenol falla en la movilización de VSs hacia la membrana. Una

posibilidad es que, incluso una estimulación moderada como la de KCl 5 mM, lleve a una situación de déficit en la disponibilidad de VSs para la liberación por depleción del RRP, que representa sólo una fracción de las VS que se reciclan (Rizzoli & Betz, 2005). En este sentido hay que tener en cuenta que la despolarización por KCl es prolongada (5 min) y, además, promueve la entrada de Ca^{2+} localizada en la zona activa. Por ello, se planteó realizar una estimulación más débil de los sinaptosomas con el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina que se inserta en la membrana y promueve una entrada de Ca^{2+} deslocalizada en el botón sináptico lo que lleva a una liberación de neurotransmisor que es independiente de la actividad de los canales de Ca^{2+} (Jovanovic *et al.*, 2001).

La concentración de ionomicina se ajustó en cada serie de experimentos para inducir una liberación de 0,4-0,7 nmoles de glutamato con el fin de dejar el margen suficiente para que la potenciación pudiese tener lugar. En estos experimentos se observó que, en los sinaptosomas WT, el agonista isoproterenol (100 μM) incrementó la liberación hasta ($0,84 \pm 0,05$ nmol/mg prot., $n=17$) desde una liberación control de ($0,47 \pm 0,03$ nmol/mg prot., $n=12$, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni Figura 30A, C). No obstante, hay que decir que el agonista isoproterenol siguió sin potenciar la liberación en los sinaptosomas *Fmr1* KO, ($0,49 \pm 0,03$ nmol/mg prot., $n=13$, en ausencia y $0,47 \pm 0,03$ nmol/mg prot., $n=13$, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 30B, C, en presencia del isoproterenol). Por tanto, la potenciación por los βARs de la liberación de glutamato en las sinapsis *Fmr1* KO parece no depender de la intensidad del estímulo empleado.

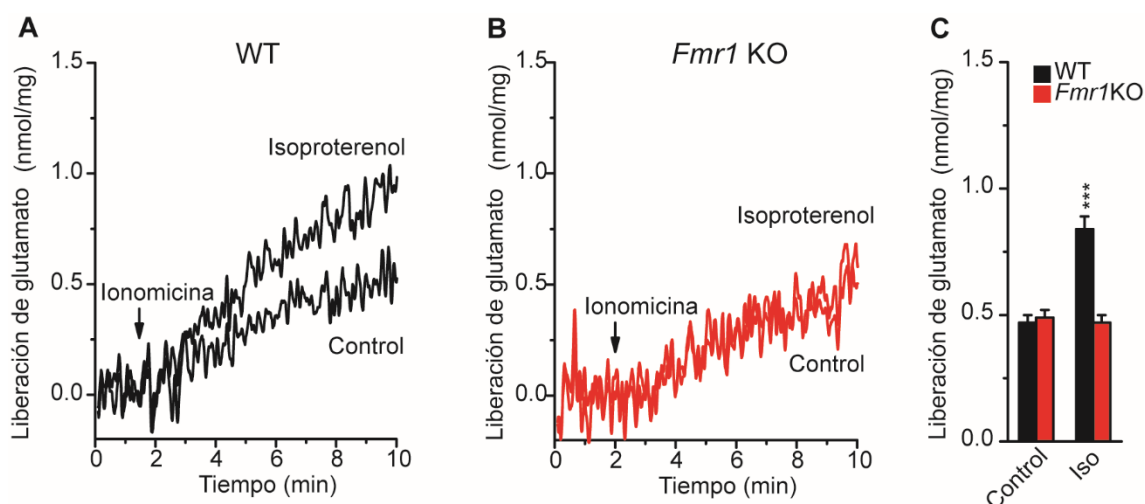


Figura 30. La potenciación por receptores β adrenérgicos de la liberación de glutamato inducida con ionomicina se pierde en ausencia de la proteína FMRP.

(A, B) Promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por ionomicina (0,5-2 μ M) en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, (A), y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del agonista β adrenérgico isoproterenol (100 μ M) añadido 1 min antes de ionomicina. Todos los experimentos se realizaron en presencia de TTx (1 μ M) añadida 2-3 min antes del inicio del registro. (C) Promedio de la liberación de glutamato en dichas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p < 0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control.

Se probó a activar la vía de señalización iniciada por el receptor β adrenérgico actuando directamente en la adenilato ciclasa con forskolina. Como era esperable, en los ratones WT la liberación inducida por ionomicina ($0,61 \pm 0,05$ nmol/mg prot., $n=4$) aumentó ($1,30 \pm 0,11$ nmol/mg prot., $n=6$, $p < 0,01$, ANOVA con Bonferroni, Figura 31A, C) tras la adición de forskolina (15 μ M). Sin embargo, en este caso sí se observó que en los sinaptosomas *Fmr1* KO la forskolina potenciaba la liberación ($0,58 \pm 0,03$ nmol/mg prot., $n=2$ y $1,16 \pm 0,09$ nmol/mg prot., $n=6$, en ausencia y en presencia del activador, $p < 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 31B, C).

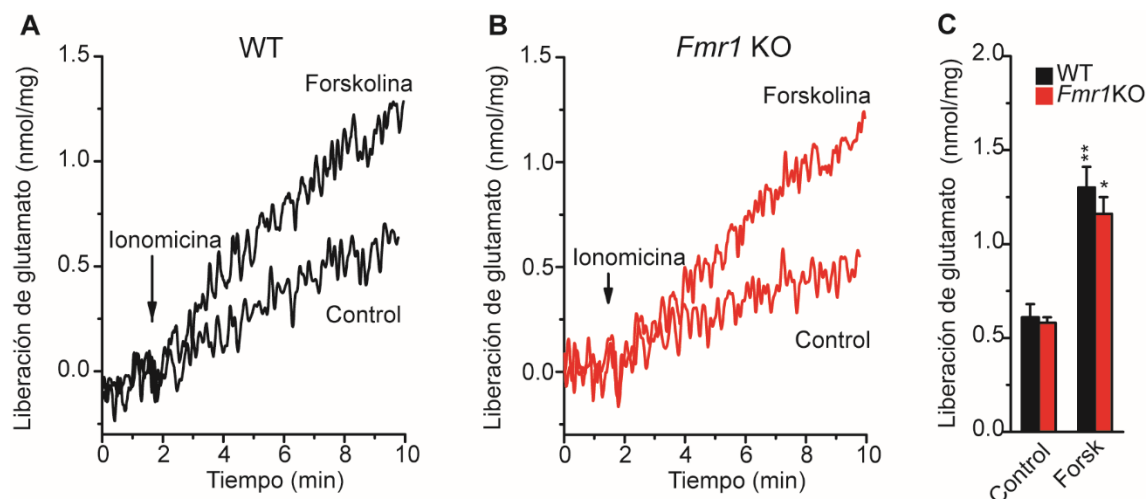


Figura 31. El activador de la adenilato ciclasa forskolina potencia la liberación de glutamato inducida por ionomicina en ausencia de la proteína FMRP.

(A, B) Promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por ionomicina (0,5-2 μ M) en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, (A), y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del activador de adenilato ciclasa forskolina (15 μ M) añadido 1 min antes de ionomicina. Todos los experimentos se realizaron en presencia de TTx (1 μ M) añadida 2-3 min antes del inicio del registro. (C) Promedio de la liberación de glutamato en dichas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *p<0,05, **p<0,01 (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control.

Dado que la señalización presináptica de los β ARs depende de proteínas Epac (Ferrero *et al.*, 2013a), se determinó si los ratones *Fmr1* KO también conservaban la capacidad de potenciación cuando se activa la vía a este nivel. La liberación de glutamato inducida por ionomicina ($0,58 \pm 0,04$ nmol/mg prot., n=4) se incrementó con el activador de Epac 8-pCPT (50 μ M) ($1,14 \pm 0,06$ nmol/mg, n=7, p<0,001, ANOVA con Bonferroni, Figura 3A, C) en los ratones WT, así como en los ratones *Fmr1* KO ($0,50 \pm 0,03$ nmol/mg prot., n=4 en ausencia y $1,07 \pm 0,07$ nmol/mg prot., n=11, p<0,001, ANOVA con Bonferroni, en presencia del activador, Figura 32B, C).

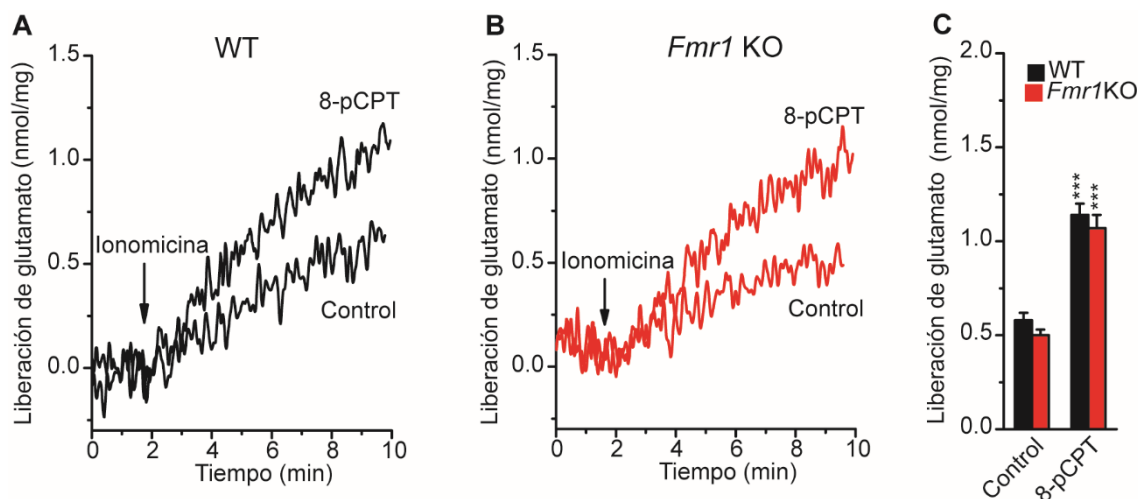


Figura 32. El activador de la proteína Epac 8-pCPT potencia la liberación de glutamato inducida por ionomicina en ausencia de la proteína FMRP.

(A, B) Promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por ionomicina (0,5-2 μ M) en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, (A), y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del activador de la proteína Epac 8-pCPT (50 μ M) añadido 1 min antes de ionomicina. Todos los experimentos se realizaron en presencia de TTx (1 μ M) añadida 2-3 min antes del inicio del registro. (C) Promedio de la liberación de glutamato en dichas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p < 0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control.

Estos datos indican que es posible recuperar la potenciación de la liberación en sinapsis *Fmr1* KO activando la vía dependiente de AMPc a distintos niveles, siempre que se utilice un estímulo débil como ionomicina. No obstante, hay que señalar que estos mismos datos también revelan la falta de eficacia del AMPc generado por el receptor para activar dicha vía y potenciar la liberación.

2.1.6. Los inhibidores de fosfodiesterasas potencian la liberación espontánea de glutamato en ausencia de FMRP.

Dado que la potenciación de la liberación de glutamato tiene lugar cuando se emplea un estímulo débil y cuando se activa la vía de señalización en alguna etapa posterior al receptor y puesto que el receptor β adrenérgico se expresa con normalidad y que es capaz de generar AMPc sin alteración, la falta

de eficacia del AMPc podría deberse a una síntesis de AMPc deslocalizada respecto de la maquinaria excitotica o a un exceso de degradación del nucleótido por las fosfodiesterasas.

El IBMX es un inhibidor no competitivo de las fosfodiesterasas 4, 3, 1, 5 y 2. Puesto que la liberación espontánea es sensible a los cambios en los niveles de AMPc (Ferrero *et al.*, 2013a) se llevó a cabo la curva dosis-respuesta sobre la liberación espontánea con distintas concentraciones de IBMX (1 μ M-1 mM, 15 min) (Figura 33) con el fin de determinar la concentración óptima del mismo. IBMX incrementó la liberación espontánea a un nivel máximo a concentraciones de 1 mM con valores similares en los sinaptosomas WT ($36,8 \pm 2,2\%$, $n=4$) y *Fmr1* KO ($36,0 \pm 0,5\%$, $n=5$, $p>0,05$, ANOVA con Bonferroni), por lo que se utilizó la concentración de 1mM en los siguientes experimentos.

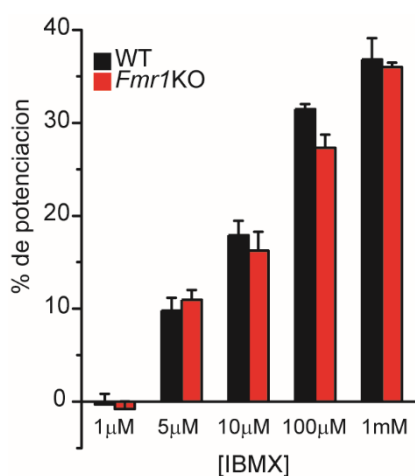


Figura 33. El inhibidor de fosfodiesterasas IBMX potencia la liberación espontánea de glutamato en ausencia de FMRP.

Potenciación de la liberación espontánea de glutamato a distintas concentraciones de IBMX (0,001-1 mM) añadido 15 min antes de iniciar el registro de liberación. La liberación se normalizó frente al control en ausencia de IBMX. Todos los experimentos se realizaron en presencia de TTx (1 μ M) añadida 2-3 min antes del inicio del registro. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). No significativo $p>0,05$ (ANOVA con Bonferroni) comparado con sinaptosomas de genotipo silvestre WT.

Como ya se ha señalado, la ausencia de potenciación de la liberación de glutamato en respuesta a la activación de los β ARs con isoproterenol no parece deberse a un fallo en la generación de AMPc sino a la ineficacia del nucleótido para activar la vía de señalización. Una posible explicación de este fenómeno es un exceso de degradación del AMPc por las fosfodiesterasas. En este sentido, se ha observado que el ARNm de la PDE2A es una diana prominente de FMRP (Maurin *et al.*, 2018a) así como el ARNm de la PDE4B (Darnell *et al.*, 2011).

Además, se ha descrito que la inhibición de la actividad fosfodiesterasa corrige el exceso de LTD dependiente de los receptores mGlu en el hipocampo de los ratones *Fmr1* KO (Darnell *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2015; Maurin *et al.*, 2018b). Por todo ello se decidió recurrir al empleo de inhibidores de fosfodiesterasas para recuperar la potenciación de la liberación de glutamato inducida por la activación de los β ARs.

En los sinaptosomas *Fmr1* KO el inhibidor de PDEs de amplio espectro IBMX (1 mM, 15 min) rescató parcialmente la potenciación por el agonista isoproterenol de la liberación inducida por ionomicina ($0,52 \pm 0,03$ nmol/mg prot., $n=8$ y $0,85 \pm 0,03$ nmol/mg prot., $n=15$, en ausencia y en presencia del agonista, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni, Figura 34B, C). La potenciación por isoproterenol (100 μ M) en los sinaptosomas WT fue, no obstante, ligeramente mayor ($p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni) ($0,67 \pm 0,01$ nmol/mg, $n=6$ en ausencia y $1,19 \pm 0,05$ nmol/mg, $n=13$, en presencia del agonista, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni, Figura 34A, C).

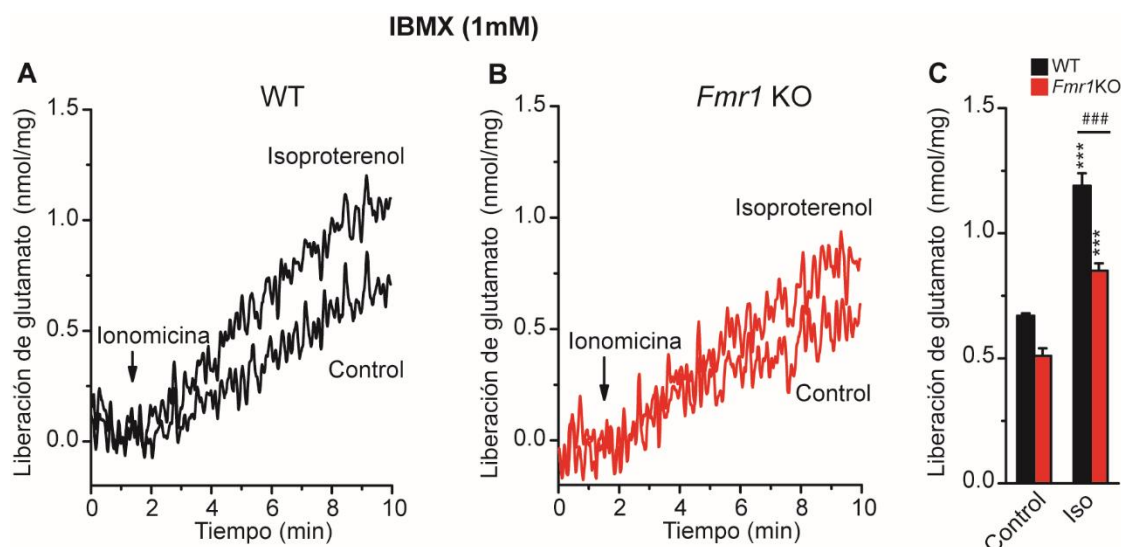


Figura 34. El inhibidor de fosfodiesterasas IBMX rescata parcialmente la potenciación por el receptor β adrenérgico de la liberación inducida por ionomicina en ausencia de la proteína FMRP.

(A, B) Promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por ionomicina (0,5-2 μ M) en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, (A), y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del agonista del receptor β 1 adrenérgico Isoproterenol (100 μ M) añadido 1 min antes de ionomicina. Los experimentos se realizaron en presencia del inhibidor de fosfodiesterasas IBMX (1 mM) añadido 15min antes de iniciar el registro de liberación. Todos los experimentos se realizaron en presencia de TTx (1 μ M) que se aplicó 2-3 min antes del inicio del registro. (C) Promedio de la liberación de glutamato en dichas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p < 0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control, ### $p < 0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados entre WT y *Fmr1* KO.

Estos resultados refuerzan la idea de que la ausencia de potenciación por los β ARs en los terminales sinápticos *Fmr1* KO se debe a una menor eficacia del AMPc para activar la vía de señalización, que se puede corregir favoreciendo la acumulación del nucleótido mediante la inhibición de su degradación por las fosfodiesterasas.

IBMX es un inhibidor de fosfodiesterasa inespecífico que no permite identificar la PDE implicada en el rescate de la potenciación de la liberación por los β ARs. PDE2A es la fosfodiesterasa más abundante la corteza cerebral (Stephenson *et al.*, 2009; Lakics *et al.*, 2010; Stephenson *et al.*, 2012). Además, PDEA2 se expresa en la membrana presináptica (Russwurm *et al.*, 2009), se localiza en la zona activa asociada a las VSs (Maurin *et al.*, 2018a) y tiene una

expresión altamente regulada por FMRP (Darnell *et al.*, 2011; Maurin *et al.*, 2018a; Maurin *et al.*, 2018b). Por ello, se empleó el inhibidor específico de PDE2A BAY 60-7550, para averiguar si esta fosfodiesterasa podía constituir una diana para el rescate de la potenciación de la liberación de glutamato.

En sinaptosomas *Fmr1* KO, BAY 60-7550 (15 min, 2 μ M) rescata en gran medida la potenciación de la liberación por isoproterenol ($0,58 \pm 0,03$ nmol/mg prot., $n=3$ y $0,90 \pm 0,05$ nmol/mg prot., $n=6$, en ausencia y presencia del agonista, respectivamente, $p=0,0039$, t de Student, Figura 35A, E) en comparación con la potenciación observada en la preparación WT en presencia de isoproterenol ($p=0,9195$, t de Student).

Este rescate por el inhibidor BAY 60-7550 fue concentración-dependiente, ya que, a concentraciones más altas (10 μ M, 15 min), incrementó la potenciación de la liberación de glutamato inducida por isoproterenol en *Fmr1* KO ($0,53 \pm 0,03$ nmol/mg prot., $n=6$ y $1,14 \pm 0,1$ nmol/mg prot., $n=14$, en ausencia y presencia del agonista, respectivamente, $p<0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 35C, E) hacia valores superiores, incluso, a los obtenidos en WT en presencia exclusivamente de isoproterenol ($p<0,05$, ANOVA con Bonferroni, datos de potenciación con isoproterenol en WT obtenidos de la Figura 30).

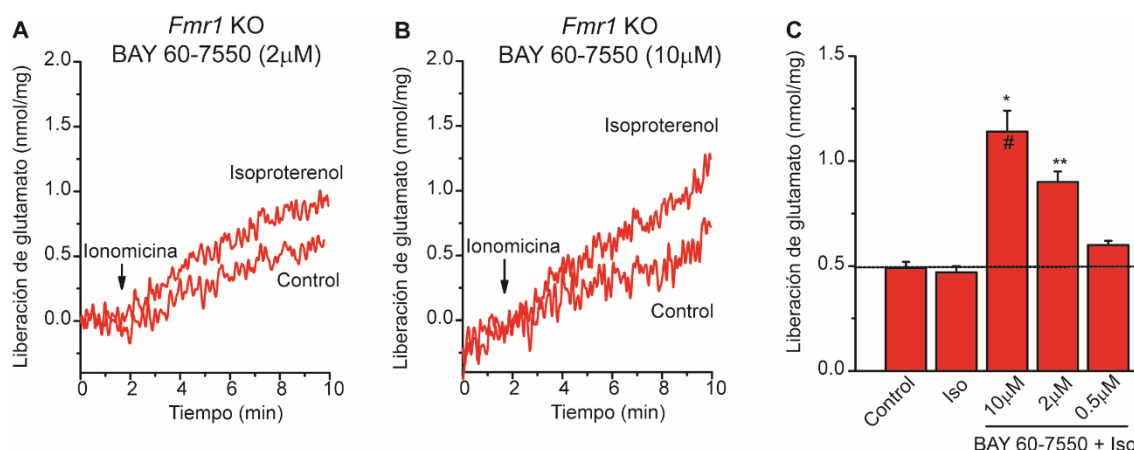


Figura 35. El inhibidor de la fosfodiesterasa 2 BAY 60-7570 rescata completamente la potenciación por el receptor β adrenérgico de la liberación inducida por ionomicina en sinaptosomas *Fmr1* KO.

(A, B) Promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por ionomicina (0,5-2 μ M) en sinaptosomas de corteza cerebral carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, en ausencia y en presencia del agonista del receptor β adrenérgico isoproterenol (100 μ M) añadido 1 min antes de ionomicina. Los experimentos se realizaron en presencia del inhibidor de la fosfodiesterasa 2 BAY 60-7550 (2 μ M) (A) y (10 μ M) (B), añadido 15 min antes de iniciar el registro. Todos los experimentos se realizaron en presencia de TTx (1 μ M) que se aplicó 2-3 min antes del inicio del registro. (C) Promedio de la liberación de glutamato en dichas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control, # $p < 0,05$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con la potenciación inducida por isoproterenol en ausencia de BAY 60-7550 en animales WT.

Por tanto, la inhibición de la PDE2A restaura la eficacia del AMPc generado por los β ARs para activar la vía que potencia la liberación.

La PDE2A es capaz de hidrolizar AMPc y GMPc teniendo, en condiciones basales, mayor preferencia por este último. Sin embargo, la presencia del GMPc induce un cambio conformacional en la PDE2A que aumenta la afinidad del enzima por el AMPc hasta 6 veces (Zhang *et al.*, 2015a). Por ello se planteó estudiar si un incremento de la actividad de la PDE2A en animales WT era capaz de suprimir la potenciación inducida por isoproterenol.

El DEANO es un donador de óxido nítrico capaz de incrementar los niveles de GMPc mediante estimulación de la guanilato ciclasa. Los resultados mostraron que el DEANO (20 μ M) revirtió la potenciación de la liberación de glutamato inducida por isoproterenol en terminaciones sinápticas WT

($0,57 \pm 0,01$ nmol/mg prot., $n=4$ y $0,5 \pm 0,03$ nmol/mg prot., $n=9$ en ausencia y en presencia de isoproterenol, $100 \mu\text{M}$, respectivamente, $p < 0,01$, ANOVA con Bonferroni, Figura 36A, B). Estos resultados parecen confirmar que la PDE2A participa en la degradación del AMPc de la ruta de los βARs .

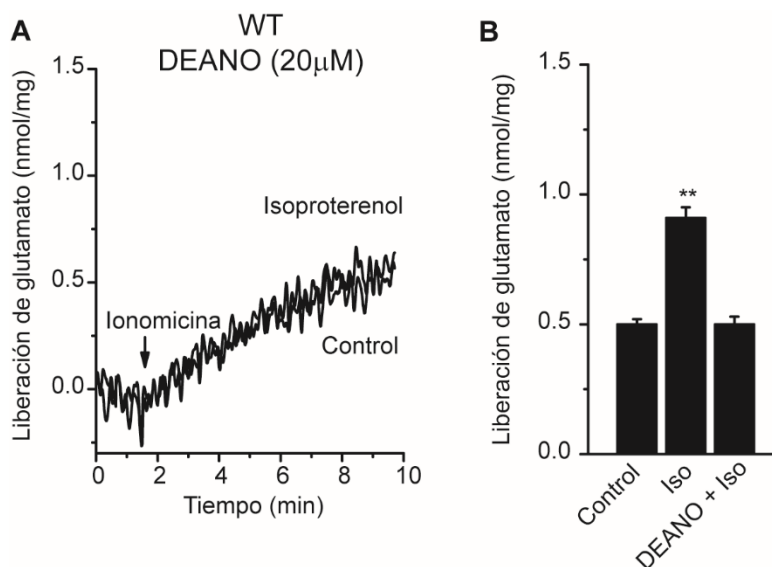


Figura 36. El donador de óxido nítrico DEANO suprime la potenciación inducida por isoproterenol en terminales cerebrocorticales WT.

(A) Promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por ionomicina ($0,5\text{-}2 \mu\text{M}$) en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT en ausencia y en presencia del agonista del receptor β adrenérgico isoproterenol ($100 \mu\text{M}$) añadido 1min antes de ionomicina. Los experimentos se realizaron en presencia del donador de NO DEANO ($20 \mu\text{M}$) añadido 3 min antes de iniciar el registro. Todos los experimentos se realizaron en presencia de TTx ($1 \mu\text{M}$) que se aplicó 2-3 min antes del inicio del registro. (B) Promedio de la liberación de glutamato en dichas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). $**p < 0,01$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control.

FMRP regula, además, la síntesis de la PDE4 (Darnell *et al.*, 2011) que también se expresa en corteza (Lakics *et al.*, 2010). Asimismo, la inhibición de esta enzima reduce el exceso de LTD inducido por la activación de mGluR en hipocampo (Choi *et al.*, 2015). Por todo esto se decidió determinar si la actividad de PDE4 es, también, responsable de la ausencia de potenciación de la liberación de glutamato observada en ratones *Fmr1* KO.

En sinaptosomas corticales de ratones carentes de FMRP, el inhibidor específico de la PDE4 rolipram ($2\text{-}50 \mu\text{M}$, 30 min) rescató la potenciación

inducida por isoproterenol de manera marginal incluso a concentraciones elevadas (50 μ M) ($0,51 \pm 0,01$ nmol/mg prot., $n=6$ y $0,68 \pm 0,04$ nmol/mg prot., $n=4$ en ausencia y en presencia de isoproterenol (100 μ M) respectivamente, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 37A, B).

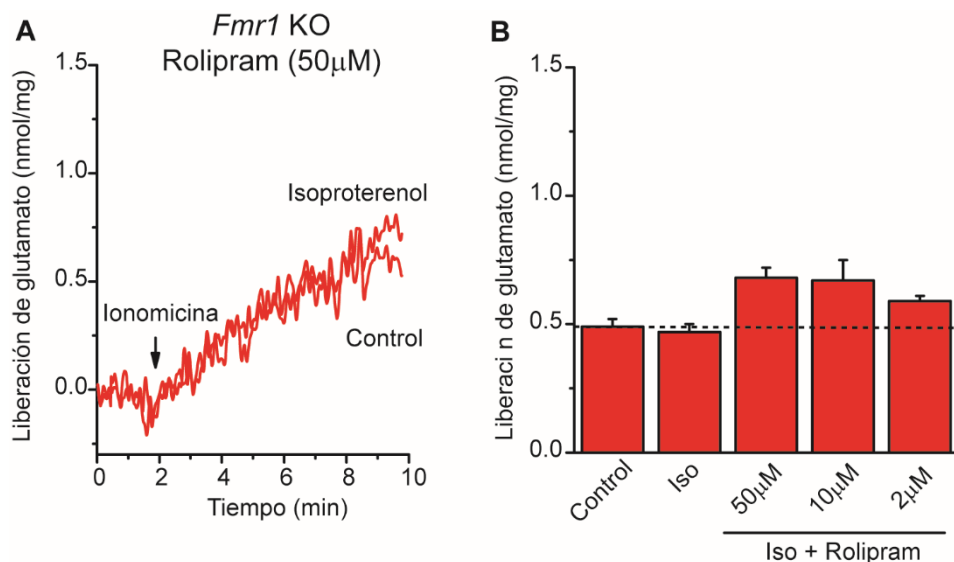


Figura 37. El inhibidor de la fosfodiesterasa 4 rolipram no rescata la potenciación por el receptor β adrenérgico de la liberación inducida por ionomicina en sinaptosomas *Fmr1* KO.

(A) Promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por ionomicina (0,5-2 μ M) en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo *Fmr1* KO en ausencia y en presencia del agonista del receptor β adrenérgico isoproterenol (100 μ M) añadido 1 min antes de ionomicina. Los experimentos se realizaron en presencia del inhibidor de PDE4 rolipram (2-50 μ M) añadido 15min antes de iniciar el registro. Todos los experimentos se realizaron en presencia de TTx (1 μ M) que se aplicó 2-3 min antes del inicio del registro. (B) Promedio de la liberación de glutamato en dichas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). No significativo $p > 0,05$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control.

Estos resultados parecen confirmar que la ausencia de potenciación mediada por los β ARs en terminales carentes de FMRP se debe a una falta de eficacia del AMPc para activar la vía y que esta situación se rescata inhibiendo a la PDE2A.

2.1.7. La disminución de la eficacia del AMPc para potenciar la liberación de glutamato no se debe a la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II.

Estudios previos han mostrado que antagonistas de los receptores mGlu del grupo II mejoran alteraciones del comportamiento en moscas y ratones carentes de la proteína FMRP (McBride *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011; Kanellopoulos *et al.*, 2012). Estos receptores se expresan a nivel pre y postsináptico (Shigemoto *et al.*, 1997; Ohishi *et al.*, 1998) e inhiben a la adenilato ciclasa vía proteínas Gi/o (Muguruza *et al.*, 2016) reduciendo los niveles de AMPc (Choi *et al.*, 2016), por lo que podrían contribuir a reducir la eficiencia del receptor β adrenérgico.

Los resultados muestran que el antagonista de los mGlu del grupo II LY341495 (400 nM) aplicado 3 minutos antes del inicio del registro no rescata la potenciación por isoproterenol de la liberación en los sinaptosomas *Fmr1* KO ($0,65 \pm 0,08$ nmol/mg prot., n=4 y $0,61 \pm 0,06$ nmol/mg prot., n=8, en ausencia y presencia de isoproterenol 100 μ M respectivamente $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 38B, C). En cambio isoproterenol potenció significativamente la liberación en sinaptosomas WT ($0,55 \pm 0,02$ nmol/mg prot., n=3 y $1,09 \pm 0,05$ nmol/mg prot., n=10 en ausencia y en presencia de isoproterenol respectivamente, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni, Figura 38A, C).

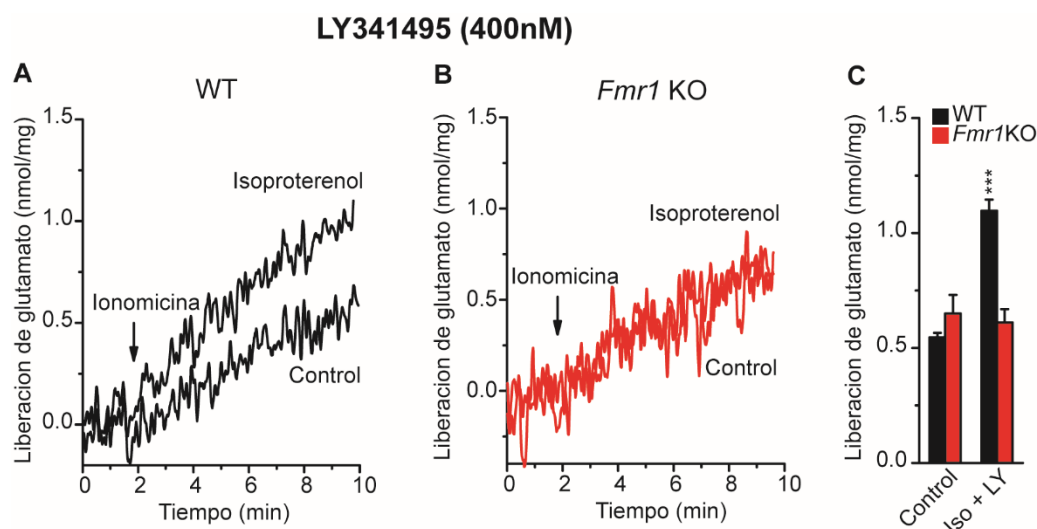


Figura 38. La disminución de la eficacia del AMPc para potenciar la liberación de glutamato inducida por ionomicina en ausencia de FMRP no se debe a la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II.

(A, B) Promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por ionomicina (0,5-2 μ M) en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, (A) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del agonista del receptor β adrenérgico isoproterenol (100 μ M) añadido 1 min antes de ionomicina. Los experimentos se realizaron en presencia del antagonista de los mGlu del grupo II LY341495 (400 nM) añadido 2-3 min antes del registro. Todos los experimentos se realizaron en presencia de TTx (1 μ M) que se aplicó 2-3 min antes del inicio del registro. (C) Promedio de la liberación de glutamato en dichas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p < 0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control.

Por tanto, la inhibición de la adenilato ciclasa por los receptores mGlu del grupo II no es responsable de la pérdida de potenciación por los β ARs en las sinapsis *Fmr1* KO.

2.1.8. El incremento en la $[Ca^{2+}]_c$ inducido por la despolarización con KCl 10mM está aumentado en ausencia de FMRP.

Como ya se ha indicado en los apartados 2.1.3 y 2.1.4., la ausencia de la proteína FMRP conlleva una alteración en la distribución de VSs que resulta en un incremento en la liberación espontánea del glutamato. La aproximación de vesículas a la membrana de la zona activa para su fusión es un proceso altamente regulado dependiente de la proteína Munc13 (Chen *et al.*, 2013; Sudhof, 2013). La activación de Munc13 está regulada por distintos factores

como DAG (Rhee *et al.*, 2002), Ca^{2+} -calmodulina (Dimova *et al.*, 2006; Dimova *et al.*, 2009) y calcio (Junge *et al.*, 2004) que se unen a la proteína y regulan su activación/translocación a la membrana y la aproximación de las VSs para su fusión (Das *et al.*, 2018). Varias alteraciones de los ratones *Fmr1* KO podrían contribuir a la existencia de un mayor número de VSs en las proximidades de la membrana: niveles de DAG elevados (Tabet *et al.*, 2016a; Tabet *et al.*, 2016b), mayor expresión de canales de Ca^{2+} del tipo N (Ferron *et al.*, 2014; Castagnola *et al.*, 2018) y fallos en la apertura de canales de K^{+} activados por Ca^{2+} (BK) con el consiguiente alargamiento del potencial de acción y una mayor entrada de Ca^{2+} (Deng *et al.*, 2013; Deng & Klyachko, 2016).

Por tanto, los cambios en la distribución de VSs en ausencia de FMRP y el consiguiente incremento de la liberación espontánea así como la incapacidad de los β ARs para potenciar la liberación podrían deberse, al menos en parte, a la mayor entrada de calcio al terminal sináptico.

Para confirmar esta hipótesis se llevaron a cabo experimentos con la sonda Fura-2 (ver apartado 2.4. de “Material y métodos”) en terminales sinápticos corticales. Los resultados mostraron que la entrada de calcio inducida por estimulación con KCl 30 mM fue similar entre animales WT ($193,6 \pm 9,4$ nM, $n=29$) y *Fmr1* KO ($199,3 \pm 7,1$ nM, $n=20$, $p=0,63$, t de Student, Figura 39A, B). Sin embargo, la estimulación con KCl 10 mM permitió detectar un mayor incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en las terminaciones sinápticas carentes de FMRP ($172,8 \pm 8,2$ nM, $n=12$) en comparación con WT ($135,4 \pm 9,6$ nM, $n=8$, $p=0,009$, t de Student, Figura 39C, D). Por lo tanto estos resultados confirman que en ausencia de FMRP aumenta la entrada de calcio ante estímulos que permiten la génesis de potenciales de acción.

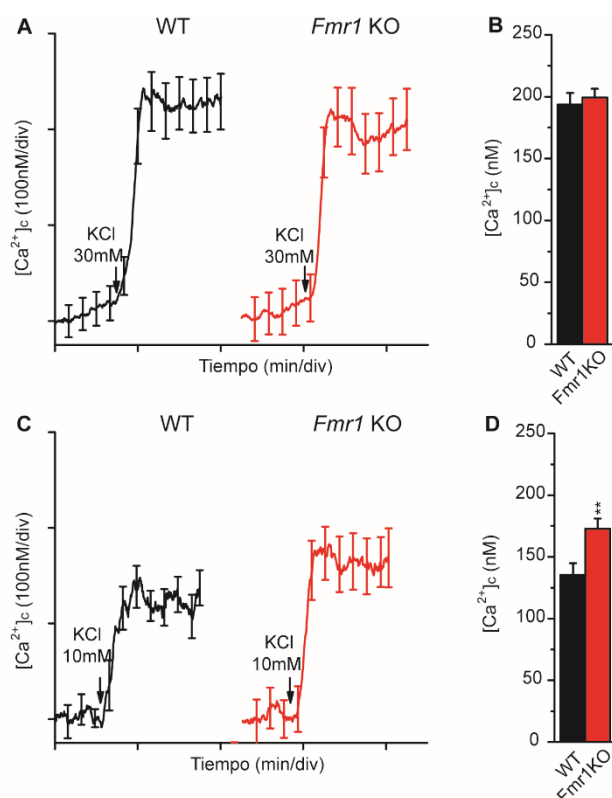


Figura 39. La estimulación con KCl 10 mM induce un mayor incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en sinaptosomas carentes de FMRP. (A, C) Promedio de registros de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por KCl 30 mM (A) y 10 mM (B) en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, medidos con la sonda fluorescente FURA2-AM añadida 25 minutos antes del inicio del registro. (B, D) Promedios de los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ en dichas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (t de Student) comparados entre animales WT y *Fmr1* KO.

Si la ausencia de movilización de VSs y de potenciación de la liberación de glutamato por los β ARs puede deberse, en parte, a una mayor entrada de calcio, entonces la reducción de la concentración de este ion podría revertir estos procesos. Así, en los sinaptosomas de ratones *Fmr1* KO incubados a una $[Ca^{2+}]_e$ de 0,1 mM, isoproterenol (100 μ M) potenció la liberación espontánea de glutamato ($1,64 \pm 0,07$ nmol/mg prot., $n=7$ y $1,98 \pm 0,08$ nmol/mg prot., $n=9$, en ausencia y presencia de isoproterenol respectivamente, $p < 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 40A, B), aunque la magnitud de la potenciación fue menor que en los sinaptosomas WT ($36,4 \pm 5,1\%$, $n=6$ y $21,7 \pm 2,1\%$, $n=9$, en animales WT y *Fmr1* KO respectivamente, $p < 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 40C).

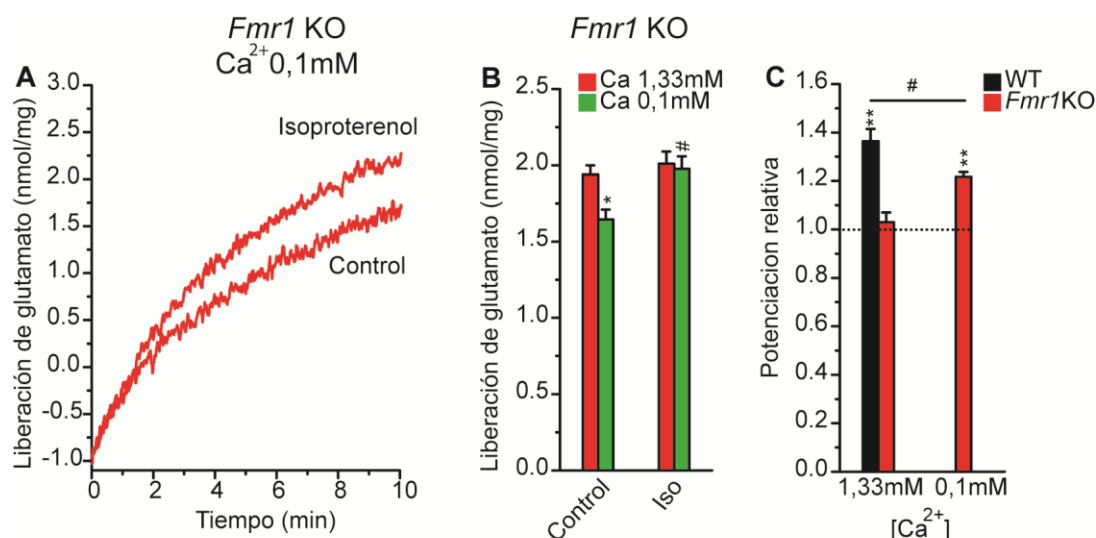


Figura 40. La disminución de la concentración extracelular de Ca²⁺ reduce la liberación espontánea y rescata la potenciación por isoproterenol en ausencia de la proteína FMRP.

(A) Promedio de registros de la liberación espontánea de glutamato en sinaptosomas de corteza cerebral carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, en ausencia y en presencia del agonista del receptor β adrenérgico isoproterenol (100 μ M) añadido 100 s después del inicio del registro. La liberación espontánea se determinó en medio con Ca²⁺ (0,1 mM) y en presencia de TTx (1 μ M) que se aplicó 2-3 min antes del inicio del registro. (B) Promedio de la liberación espontánea de glutamato en sinaptosomas *Fmr1* KO a 0,1 mM Ca²⁺ y a 1,33 mM Ca²⁺ (estos últimos datos tomados de la **Figura 29**). (C) Promedio de la potenciación por isoproterenol de la liberación espontánea de glutamato en sinaptosomas de animales *Fmr1* KO a 1,33 y a 0,1 mM Ca²⁺ y en sinaptosomas de animales de genotipo silvestre, WT, a 1,33 mM Ca²⁺. Los datos se normalizaron frente a su correspondiente control en ausencia de isoproterenol. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). * $p < 0,05$ en **Figura 40B** (ANOVA con Bonferroni) comparados con el dato de Ca 1,33 mM. # $p < 0,05$ en **Figura 40B** (ANOVA con Bonferroni) comparado con el valor correspondiente control. ** $p < 0,01$ en **Figura 40C** (ANOVA con Bonferroni) comparado con el valor correspondiente en ausencia de isoproterenol. # $p < 0,05$ en **Figura 40C** (ANOVA con Bonferroni) comparación entre animales WT y *Fmr1*KO.

Estos resultados sugieren que la falta de la potenciación de la liberación de glutamato por los β ARs en ausencia de FMRP en corteza se debe, tanto a una disminución de la eficacia del AMPc para activar la vía, como a una mayor entrada de calcio al terminal sináptico que afecta a la distribución de las VSs.

2.2. Potenciación por receptores β adrenérgicos en cerebelo.

Los resultados obtenidos con los sinaptosomas de corteza cerebral llevaron a plantear una doble pregunta. ¿Es necesaria la potenciación por los

β ARs en alguna forma de plasticidad presináptica? Y en el caso de que sea así, ¿está alterada esta forma de plasticidad presináptica en los ratones *Fmr1* KO? Para responder a estas cuestiones se decidió realizar experimentos en las sinapsis del cerebelo entre las fibras paralelas de las células granulares y las células de Purkinje (PF-PC) ya que estas sinapsis expresan una LTP dependiente de AMPc (Salin *et al.*, 1996; Storm *et al.*, 1998) que requiere un incremento en la liberación de neurotransmisor y que implica a la proteína de la zona activa RIM1 α (Lonart *et al.*, 2003).

Además, en FXS se han descrito alteraciones relacionadas con la función del cerebelo (Huber, 2006). En los ratones *Fmr1* KO se ha relacionado el alargamiento en las espinas dendríticas de las células de Purkinje con el exceso de LTD dependiente de receptores mGlu y el déficit en el test de condicionamiento del parpadeo (Koekkoek *et al.*, 2005), que es uno de las pruebas de comportamiento empleadas para la evaluación de la función cerebelar. Asimismo, tanto en modelos animales como en pacientes de FXS se han descrito alteraciones motoras (Zingerevich *et al.*, 2009; Vinueza Veloz *et al.*, 2012) asociadas a las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje y su participación en el aprendizaje motor (Ly *et al.*, 2013; Hoxha *et al.*, 2016).

2.2.1. La ausencia de FMRP incrementa la liberación espontánea de glutamato y ocluye la potenciación inducida por isoproterenol en sinaptosomas de cerebelo, aunque no afecta a la expresión de los β ARs ni a la síntesis de AMPc.

Antes de estudiar la relevancia de los receptores β ARs en la plasticidad de las sinapsis PF-PC del cerebelo y su posible alteración en el síndrome del X frágil, se determinó si, al igual que en los sinaptosomas de corteza, los receptores β adrenérgicos también potencian la liberación espontánea de glutamato en los sinaptosomas de cerebelo y si esta potenciación también se pierde en los sinaptosomas *Fmr1* KO. Los experimentos de liberación espontánea de glutamato mostraron que, en animales WT, la liberación basal

($1,12 \pm 0,04$ nmol/mg prot., $n=7$) aumentaba con isoproterenol ($100 \mu\text{M}$) ($1,47 \pm 0,05$ nmol/mg prot., $n=8$, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni, Figura 41A, C), mientras que en ratones *Fmr1* KO la liberación basal, que mostró una tendencia hacia valores mayores que en ratones WT aunque no alcanzó el nivel de significación estadística ($1,28 \pm 0,02$ nmol/mg, $n=6$), no aumentó con el isoproterenol ($1,29 \pm 0,03$ nmol/mg, $n=7$, $p=0,71$, ANOVA con Bonferroni, Figura 41B, C). Por tanto, igual que ocurre en los sinaptosomas corticales, en el cerebelo la potenciación por isoproterenol está parcialmente ocluida por la mayor liberación espontánea basal asociada a la pérdida de la proteína FMRP.

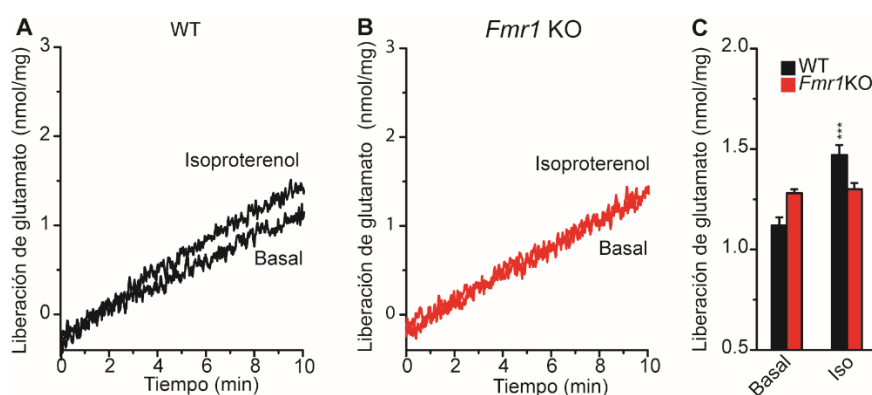


Figura 41. La ausencia de FMRP incrementa la liberación espontánea de glutamato y ocluye la potenciación inducida por isoproterenol en sinaptosomas de cerebelo.

(A, B) Modulación de la liberación espontánea de glutamato inducida por el agonista del receptor β adrenérgico Isoproterenol ($100 \mu\text{M}$) en sinaptosomas de cerebelo de animales genotipo silvestre, WT, (A), y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1*KO, (B), en presencia del bloqueante de canales de Na^+ TTx ($1 \mu\text{M}$), el cual fue añadido 2-3 min antes de empezar el registro. El isoproterenol fue añadido 100 s después del inicio del registro. (C) Promedio de la liberación espontánea de glutamato en dichas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p < 0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control.

Con el fin de descartar que un cambio en la expresión de los receptores β ARs presinápticos fuera responsable de la pérdida de la potenciación en ratones *Fmr1* KO, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia con anticuerpos contra el receptor $\beta 1$ adrenérgico y contra la proteína vesicular sinaptofisina utilizada como marcador de toda la población de sinaptosomas. Los resultados mostraron que el receptor se expresa en el $24,9 \pm 1,1\%$ de los

terminales sinápticos en los sinaptosomas WT (63 campos analizados, Figura 42A, C) y en el $26,8 \pm 0,9\%$ de los botones sinápticos de ratones *Fmr1* KO (75 campos analizados, $p=0,2002$, *t* de Student, Figura 42B, C). Estos resultados permiten concluir que la ausencia de FMRP no altera la expresión de los receptores β_1 adrenérgicos en la presinapsis.

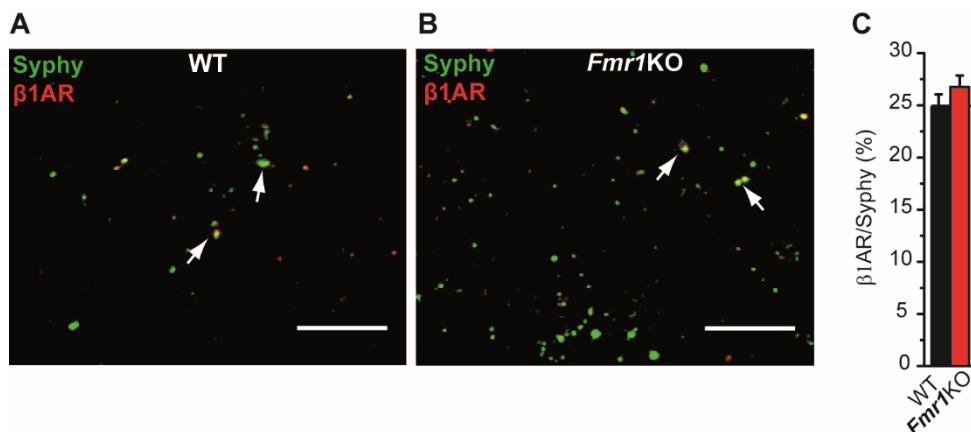


Figura 42. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la expresión del receptor β_1 adrenérgico en sinaptosomas de cerebelo.

(A, B) Inmunofluorescencia de sinaptosomas de cerebelo de genotipo salvaje, WT, (A) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), fijados en cubreobjetos polilisina y teñidos con anticuerpos contra el receptor β_1 adrenérgico (1:200) y la proteína vesicular sinaptofisina (1:500). Barra de escala, 5 μ m. (C) Cuantificación de la expresión de β_1 AR en sinaptosomas WT y *Fmr1* KO marcados con sinaptofisina. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). No significativo, $p>0,05$ (*t* de Student) comparado con sinaptosomas WT.

Se determinó también la capacidad del receptor para generar AMPc. En los sinaptosomas *Fmr1* KO los niveles de AMPc se incrementaron con isoproterenol (100 μ M) ($120,10 \pm 3,36\%$, $n=5$, $p>0,05$, ANOVA con Bonferroni) y forskolina (15 μ M) ($387,89 \pm 42,72\%$, $n=2$, $p<0,001$, ANOVA con Bonferroni) de manera similar a lo observado en los sinaptosomas de ratones WT ($124,06 \pm 3,26\%$, $n=5$, $p>0,05$, ANOVA con Bonferroni) para isoproterenol y ($384,30 \pm 23,01\%$, $n=2$, $p<0,001$, ANOVA con Bonferroni) para forskolina (Figura 43). Por tanto, la generación de AMPc por el receptor β AR no está alterada en los sinaptosomas *Fmr1* KO de cerebelo.

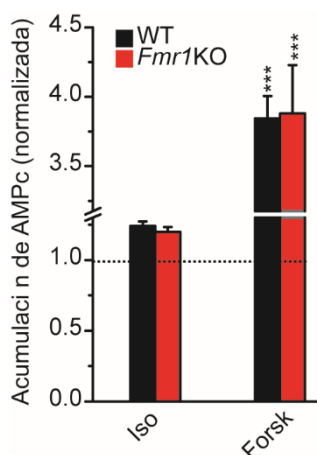


Figura 43. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la generación de AMPc inducida por el receptor β adrenérgico o por forskolina en sinaptosomas de cerebelo.

El isoproterenol (100 μ M, 10 min) y la forskolina (15 μ M, 10 min) se añadieron 5min después de IBMX (15 min, 1 mM, ver Materiales y Métodos). La acumulación de AMPc inducida se normalizó respecto de los valores basales de sinaptosomas de cerebelo sin tratar. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p < 0,001$ (ANOVA con Bonferroni).

2.2.2. La ausencia de la proteína FMRP incrementa la frecuencia de las mEPSCs basalmente y ocluye la potenciación por del receptor β adrenérgico.

Basándose en los datos obtenidos en sinaptosomas de cerebelo, que deben estar constituidos mayoritariamente por los botones sinápticos de las células granulares dada la abundancia de las mismas (Andersen *et al.*, 1992), se realizaron experimentos de transmisión sináptica en rodajas de cerebelo para estudiar la acción potenciadora de los receptores β adrenérgicos. En primer lugar, se determinó la liberación espontánea, en ausencia de estimulación y en presencia de TTx (1 μ M), midiendo las mEPSCs (del inglés *miniature Excitatory PostSynaptic Currents*) en registros de célula completa sobre las células de Purkinje mantenidas a -70 mV (ver apartado 2.8. de “Material y métodos”).

En las rodajas cerebelares de ratones WT, el isoproterenol (100 μ M) incrementó la frecuencia de las mEPSCs (de $1,20 \pm 0,1$ Hz a $1,72 \pm 0,1$ Hz, $n=17$ células, 7 ratones, $p < 0,01$, ANOVA con Bonferroni, Figura 44A, B, C, E) sin cambios en la amplitud ($12,5 \pm 0,3$ pA y $12,4 \pm 0,5$ pA, en ausencia y presencia de isoproterenol, respectivamente, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 44F, G, H). Sin embargo, los ratones *Fmr1* KO mostraron una tendencia a mostrar una mayor frecuencia basal que los animales WT ($1,57 \pm 0,1$ Hz, $n=17$ células, 8 ratones) que fue insensible al isoproterenol ($1,68 \pm 0,09$ Hz, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni Figura 44A, B, D, E). En este último caso, la amplitud de las mEPSCs tampoco cambió en presencia del agonista ($12,9 \pm 0,5$ pA y $12,7 \pm 0,4$ pA, respectivamente, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 44F, G, I).

Por lo tanto, en ausencia de FMRP se confirma que hay una liberación espontánea de neurotransmisor mayor que en animales WT y que este fenómeno ocluye la potenciación de la liberación de neurotransmisor inducida por el receptor β adrenérgico.

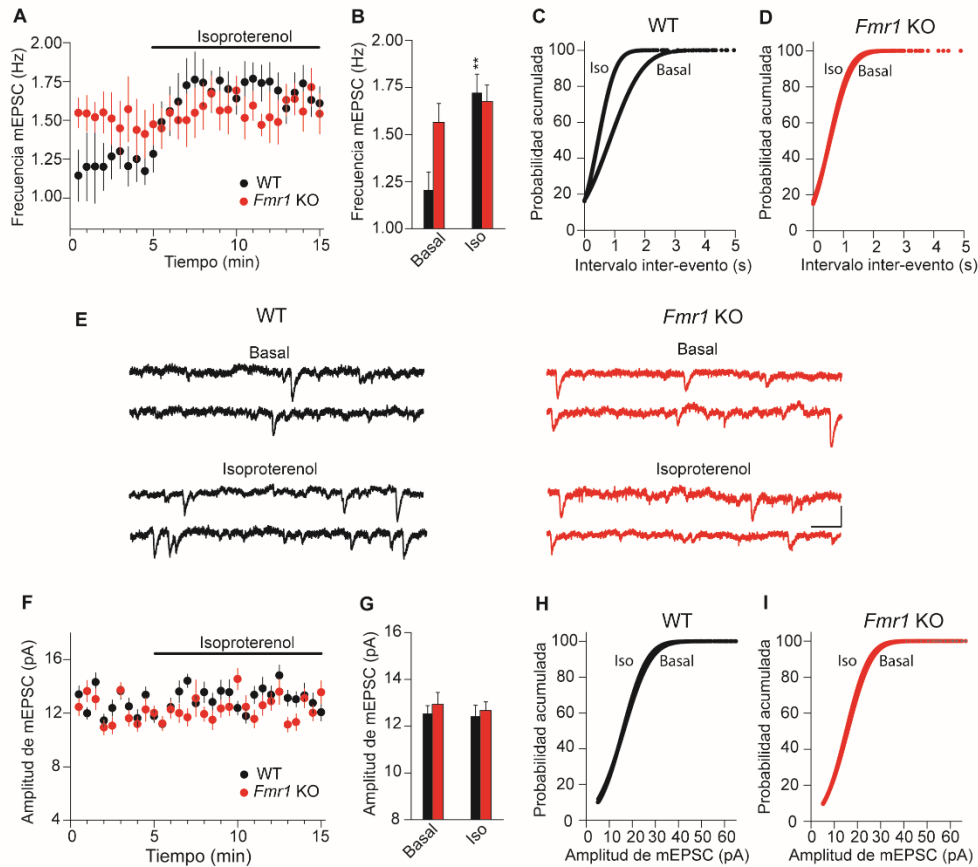


Figura 44. La ausencia de la proteína FMRP incrementa la frecuencia de las mEPSCs basalmente y ocluye la potenciación por del receptor β adrenérgico.

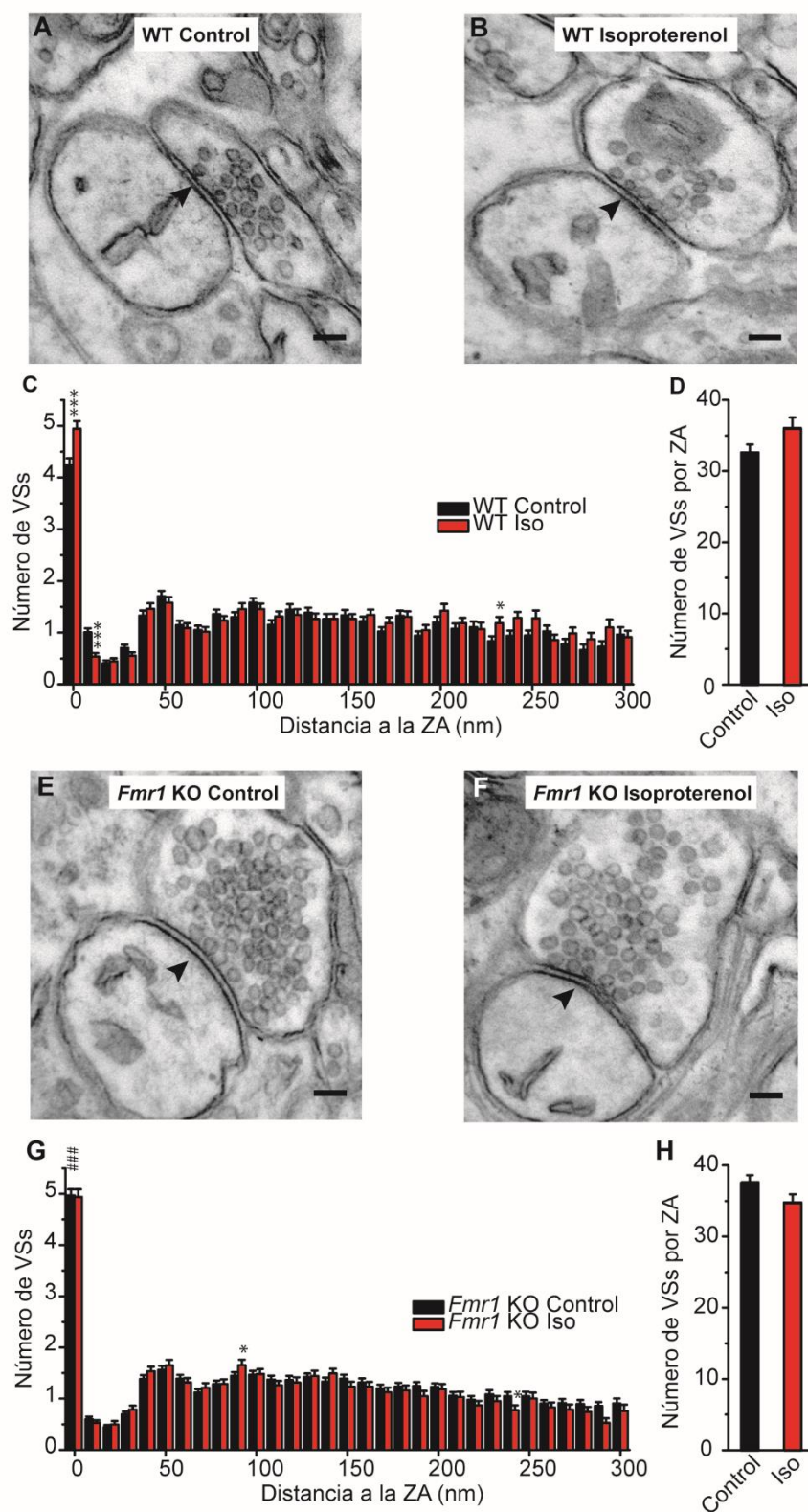
(A) Isoproterenol (100 μ M, 10 min) aumenta la frecuencia de las mEPSCs en las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje (PF-PC) en rodajas de cerebelo de animales de genotipo salvaje, WT, pero no en los que carecen de la proteína FMRP, *Fmr1*KO. (B) Cuantificación los cambios en la frecuencia de las mEPSCs medidos 5min antes y después de la adición del isoproterenol. (C, D) Curvas de la probabilidad acumulada de los cambios en la frecuencia de las mEPSCs inducidos por isoproterenol en animales WT (C) o *Fmr1*KO (D). (E) Registros representativos antes y después de la adición de isoproterenol en animales WT y *Fmr1* KO. (F) Efecto del isoproterenol en la amplitud de las mEPSCs en animales WT y *Fmr1* KO. (G) Cuantificación de la amplitud de las mEPSCs medida durante 5min antes y después de la adición del isoproterenol en animales WT y *Fmr1* KO. (H, I) Curvas de la probabilidad acumulada de los cambios en la amplitud de las mEPSCs inducidos por isoproterenol en animales WT (H) o *Fmr1*KO (I). Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error).

** $p < 0,01$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos basales.

2.2.3. Las sinapsis cerebelares carentes de la proteína FMRP presentan mayor número de vesículas sinápticas en contacto con la membrana presináptica y el isoproterenol no aumenta este número.

La potenciación de la liberación espontánea de glutamato por los β ARs requiere un incremento en el número de VSs próximas a la membrana (Ferrero *et al.*, 2013a). Puesto que los ratones *Fmr1* KO presentan alteraciones en la distribución de vesículas en hipocampo (Deng *et al.*, 2011b; Klemmer *et al.*, 2011) que también han sido observadas en corteza (apartado 2.1.3.) se estudió la distribución de las VSs en las sinapsis entre PF-PC.

Se analizó la distribución de VSs en la capa granular de rodajas de cerebelo mediante microscopía electrónica de transmisión y se observó que el número de VSs amarradas a la membrana en animales WT aumentaba en presencia de isoproterenol (100 μ M, 10 min) de ($4,17 \pm 0,11$ vesículas, $n=250$ sinapsis, 3 ratones) a ($4,99 \pm 0,11$ vesículas, $n=203$ sinapsis, 3 ratones, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni Figura 45A, B, C) sin cambios en el número total de vesículas ($32,02 \pm 0,8$ y $32,57 \pm 0,95$ vesículas en ausencia y presencia de isoproterenol respectivamente, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 45D). Sin embargo, los ratones *Fmr1* KO tienen un número mayor de VSs en contacto con la membrana ($4,97 \pm 0,12$ vesículas, $n=257$ sinapsis analizadas, 4 ratones, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni), y este número no aumenta con isoproterenol ($4,96 \pm 0,12$ vesículas, $n=224$ sinapsis analizadas, 4 ratones, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 45E, F, G). Además, el isoproterenol tampoco alteró el número total de vesículas en ausencia de FMRP ($34,8 \pm 0,9$ y $33,9 \pm 0,9$ vesículas en ausencia y presencia de isoproterenol respectivamente, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 45H). Por tanto, la potenciación de la liberación espontánea por los β ARs en las sinapsis PF-PC *Fmr1* KO parece estar ocluida por un mayor número de VSs dispuestas en la membrana que presentan estas sinapsis basalmente.



*** $p < 0.001$ (t de Student) comparados con datos control. ### $p < 0.001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados entre animales WT y *Fmr1*KO.

Figura 45. Las sinapsis cerebelares carentes de la proteína FMRP presentan mayor número de vesículas sinápticas en contacto con la membrana presináptica y el isoproterenol no aumenta este número.

(A, B, E, F) Micrografías electrónicas representativas de la distribución de vesículas en terminales de las sinapsis PF-PC de rodajas cerebelo de animales de genotipo silvestre, WT (A, B) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (E, F) en condiciones basales (A, E) o tras el tratamiento con isoproterenol (100 μ M, 10min) (B, F). Barra de escala 100 nm. (C, G) Cuantificación de la distribución de las VSs relativa a la distancia a la membrana de la zona activa (distribuidas en intervalos de 10 nm) en las rodajas de animales WT (C) y *Fmr1* KO (G). (D, F) Número total de vesículas por sinapsis en animales WT (D) y *Fmr1* KO (H). Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). * $p < 0.05$,

2.2.4. La LTP de las sinapsis PF-PC requiere la activación de los β ARs y un aumento en el tamaño del RRP y está ausente en las sinapsis *Fmr1* KO

Las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje expresan una forma de LTP presináptica que implica un aumento de la liberación de neurotransmisor dependiente de la maquinaria exocitótica. En este sentido, los β ARs de los botones sinápticos glutamatérgicos podrían participar en esta forma de plasticidad contribuyendo a incrementar la liberación y promover que haya más vesículas colocadas en la proximidad de la membrana. Por ello, se planteó, en primer lugar, conocer si estos receptores participan en la LTP de las sinapsis PF-PC. La estimulación de las fibras paralelas (10 Hz, 10 s) llevó a un incremento duradero de la amplitud de las EPSCs ($160,0 \pm 9,6\%$, $n=9$ células, 5 ratones, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni, Figura 46A, B) compatible con la inducción de la LTP. La incubación de las rodajas con el antagonista de los β ARs propranolol previno la inducción de la LTP ($96,1 \pm 11,6\%$ frente a un basal de $104,2 \pm 5,5\%$, $n=10$ células, 6 ratones, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 46A, B). Esta LTP es de origen presináptico ya que conlleva una disminución del PPR (del inglés *Paired Pulse Ratio*) en intervalos de 80ms ($1,78 \pm 0,12$ y $1,46 \pm 0,06$ antes y después del estímulo de 10Hz, respectivamente, $p < 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 46C, D). Sin embargo, en los ratones *Fmr1* KO el mismo estímulo de 10 Hz no induce LTP ($95,9 \pm 4,5\%$ y $94,7 \pm 7,8\%$ antes y después de la estimulación respectivamente, $n=12$ células, 9 ratones, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 46A, B). Luego, la LTP de las fibras paralelas requiere la activación de los receptores β ARs, implica cambios presinápticos y está ausente en los ratones *Fmr1* KO.

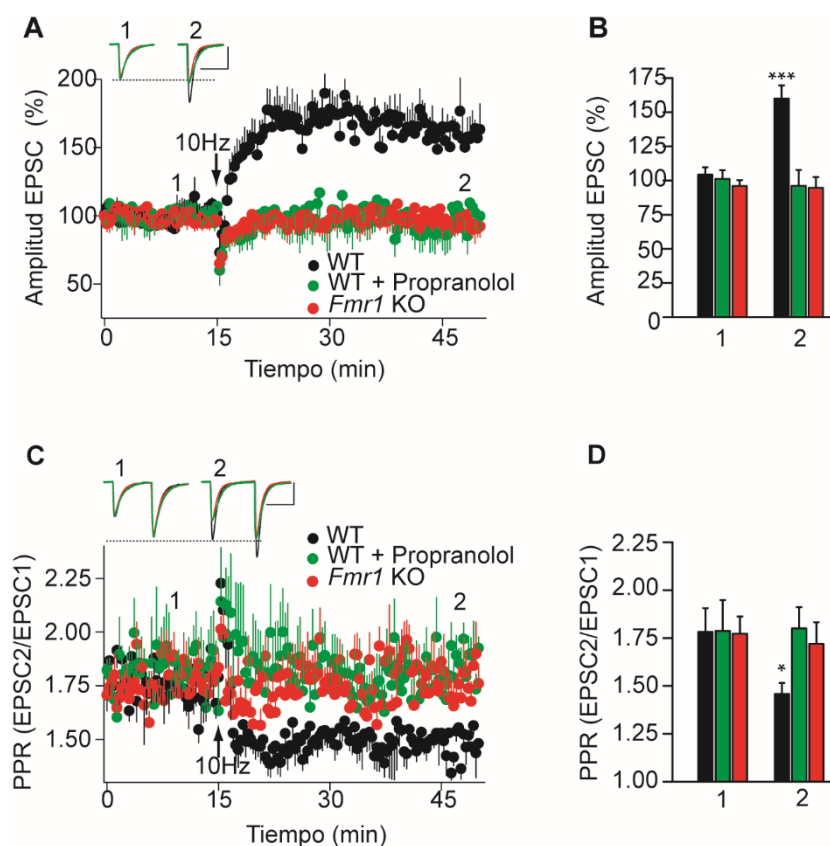


Figura 46. La PF-PC LTP requiere la activación de los receptores β adrenérgicos presinápticos y se pierde en las rodajas de cerebelo carentes de la proteína FMRP.

(A) Efecto de la estimulación de 10Hz sobre la amplitud de la EPSC en las sinapsis PF-PC de rodajas de cerebelo de animales de genotipo silvestre, WT, en presencia y ausencia del antagonista de receptores β adrenérgicos propranolol (100 μ M) y en animales carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO. El propranolol se añadió 30 min antes de la inducción de la LTP. El gráfico incluye la media de 6 EPSCs consecutivas de 0,05 Hz. (B) Promedio de los cambios en la amplitud de las EPSC en animales WT en ausencia y en presencia de propranolol y *Fmr1* KO medidos antes de la estimulación (1) y 30 min después de la estimulación (2). (C) Cambios en el cociente de pulsos apareados, PPR, EPSC2/EPSC1, inducidos por un estímulo de 10Hz en animales WT con y sin propranolol y en rodajas de animales *Fmr1* KO. (D) Promedio de los cambios en la PPR en animales WT con y sin propranolol y en rodajas *Fmr1* KO, medidos antes de la estimulación (1) y 30 min después de la estimulación (2). Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos basales.

Dado que los β ARs participan en la LTP se cuestionó si estos receptores lo hacen también poniendo más vesículas en contacto con la membrana plasmática en la zona activa. En este caso se determinó el tamaño del conjunto de VSs que están dispuestas para la liberación o RRP, que representa el correlato funcional de las vesículas colocadas en contacto con la membrana

(Rosenmund & Stevens, 1996; Schikorski & Stevens, 2001). El tamaño del RRP puede determinarse mediante un estímulo suficiente que deplete el RRP. Así la representación de la amplitud acumulada de las EPSCs permite calcular el tamaño del RRP como la intersección con el eje de ordenadas de la prolongación desde el estado estacionario (Schneppenburger *et al.*, 2002).

Las rodajas se estimularon a 40 Hz durante 2,5 s en condiciones basales o 30 min después de la inducción de la LTP por estimulación de las fibras paralelas a 10 Hz durante 10s (Castillo *et al.*, 2002). En ratones WT, el RRP medido en condiciones basales antes de la estimulación ($5273,3 \pm 773,3$ pA, $n=11$ células, 5 ratones) se incrementó hasta ($9177,7 \pm 747,5$ pA, $n=14$ células, 6 ratones, $p < 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 47A, B) tras la inducción de la LTP. En el caso de los ratones *Fmr1* KO, las sinapsis PF-PC presentaron un RRP que ya era ligeramente mayor de manera basal ($8209,6 \pm 836,0$ pA, $n=13$ células, 6 ratones, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni) y que no aumentó más tras la estimulación de 10Hz ($8831,3 \pm 952,4$ pA, $n=13$ células, 6 ratones, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 47C, D). Luego, igual que se había observado en la liberación espontánea, la LTP está ocluida en las sinapsis PF-PC *Fmr1* KO.

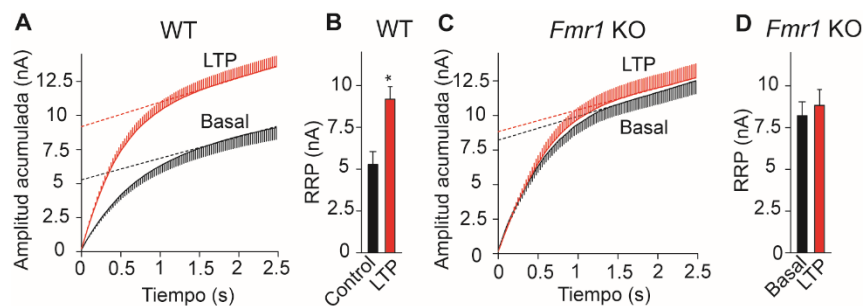


Figura 47. La ausencia de proteína FMRP incrementa el tamaño del RRP y la inducción de la LTP lo aumenta más.

(A, C) El tamaño del RRP se calculó partir de la intersección con el eje de ordenadas de la representación acumulada de la amplitud tras el estado estacionario con un tren de pulsos de alta frecuencia (100 pulsos de 40 Hz) antes y 30 min después de la inducción de la LTP en animales genotipo silvestre, WT, (A), y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (C). (B, D) Cuantificación del tamaño del RRP en animales WT (B) y *Fmr1* KO (D). Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). * $p < 0,05$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos basales.

2.2.5. La reducción de la concentración de calcio extracelular rescata la potenciación por receptores β adrenérgicos de la frecuencia de las mEPSCs en las sinapsis PF-PC de cerebelo carentes de la proteína FMRP.

Como ya se indicó en el apartado 2.1.8, en ausencia de FMRP se ha observado un incremento en la entrada de calcio al terminal sináptico de neuronas corticales, posiblemente por la existencia de un mayor número de VDCCs de tipo N (Ferron *et al.*, 2014; Castagnola *et al.*, 2018), así como por la disfunción en la regulación de los canales BK (Deng *et al.*, 2013; Deng & Klyachko, 2016). Este calcio favorece la activación de proteínas implicadas en la maquinaria exocitótica como Munc13 (Dimova *et al.*, 2006; Dimova *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2010), y podría contribuir, junto a otros factores, a la aproximación de vesículas sinápticas a la membrana de la zona activa y al incremento del RRP (Thanawala & Regehr, 2013; Imig *et al.*, 2014).

Por ello, se estudió la influencia del calcio sobre las EPSCs inducidas por los β ARs en ratones *Fmr1* KO. Las rodajas de cerebelo de ratones *Fmr1* KO se incubaron con bajas concentraciones de calcio (1 mM) durante, al menos, 1 h y se determinó la frecuencia basal de las mEPSCs observándose una disminución de la misma ($1,07 \pm 0,12$ Hz, $n=10$ células, 5 ratones, Figura 48A, B, C, D) hasta valores muy próximos a los de las rodajas WT en presencia de concentraciones normales de calcio ($1,20 \pm 0,1$ Hz, $p=0,4234$, t de Student, Figura 48A, B, C, E). En estas condiciones, el isoproterenol incrementó la frecuencia de las mEPSCs en ratones *Fmr1* KO hasta $1,61 \pm 0,18$ Hz ($n=10$ células, 5 ratones, $p=0,0225$, t de Student, Figura 48A, B, C, D) sin afectar a la amplitud ($13,0 \pm 0,5$ pA y $13,2 \pm 0,6$ pA en ausencia y presencia de isoproterenol 100 μ M respectivamente, $p=0,8008$, t de Student, Figura 48E, F). Estos resultados indican que la disminución del calcio extracelular corrige el aumento de la frecuencia basal de las mEPSCs de las sinapsis *Fmr1* KO.

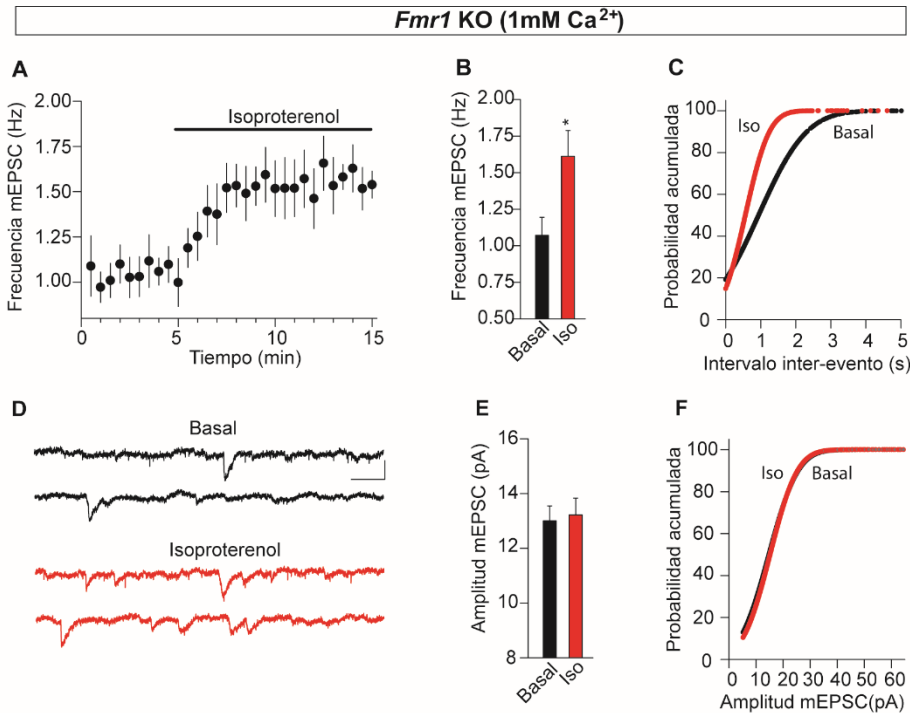


Figura 48. La reducción de la concentración de calcio extracelular rescata la potenciación por receptores β adrenérgicos de la frecuencia de las mEPSCs en las sinapsis PF-PC de cerebelo carentes de la proteína FMRP.

(A) El isoproterenol (100 μ M, 10 min) aumenta la frecuencia de las mEPSCs en rodajas de cerebelo *Fmr1* KO mantenidas en presencia de Ca^{2+} 1 mM. (B) Cuantificación de los cambios en la frecuencia de las mEPSCs medidas 5 min antes y después de la adición de isoproterenol. (C) Curvas de la probabilidad acumulada de los cambios en la frecuencia de las mEPSCs inducidos por isoproterenol. (D) Registros representativos antes y después de la adición de isoproterenol. (E) Curvas de la probabilidad acumulada de los cambios en la amplitud de las mEPSCs inducidos por isoproterenol. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). * $p < 0,05$ (*t* de Student) comparados con datos basales.

2.2.6. La reducción de la concentración de calcio extracelular rescata la LTP y normaliza el tamaño del RRP en las sinapsis PF-PC de cerebelo carentes de la proteína FMRP.

El hecho de que una bajada en la concentración de Ca^{2+} extracelular rescate la potenciación por los β ARs de la frecuencia de las mEPSCs, sugiere un posible rescate de la LTP, que en estas sinapsis es dependiente de la acción de estos receptores. Efectivamente, la disminución del calcio extracelular fue capaz de rescatar la LTP en animales *Fmr1* KO ($147,1 \pm 8,3\%$ en comparación con el basal $102,4 \pm 5,5\%$, $n = 14$ células, 7 ratones, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni,

Figura 49A, B). Es importante señalar que en las rodajasl WT estimuladas a esta baja $[Ca^{2+}]_e$ (1 mM) no generan LTP ($98,7 \pm 5,7\%$ y $98,1 \pm 89,4\%$ antes y después de la inducción de la LTP respectivamente, $n=10$ células, 4 ratones $p>0,05$, ANOVA con Bonferroni) resultado que coincide con los de estudios previos que muestran la sensibilidad de la LTP de las fibras paralelas a los cambios en la concentración de calcio (Myoga & Regehr, 2011). Además, la LTP rescatada por la bajada en el $[Ca^{2+}]_e$ en ratones *Fmr1* KO es sensible al antagonista de los β ARs propranolol que bloqueó la inducción de la LTP ($98,0 \pm 8,1\%$ y $98,8 \pm 3,1\%$ antes y después de la estimulación respectivamente, $n=9$ células, 4 ratones, $p>0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 49A, B).

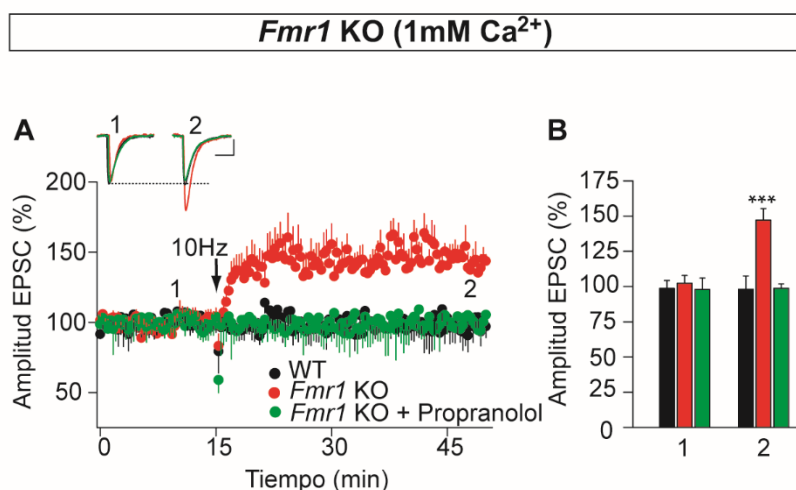


Figura 49. La reducción de la concentración de calcio extracelular rescata la LTP de las sinapsis PF-PC de cerebelo carentes de la proteína FMRP.

(A) La reducción de la $[Ca^{2+}]_e$ a 1 mM recupera la LTP de las sinapsis PF-PCs en rodajas de cerebelo de animales carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO. Las EPSCs se registraron de células de Purkinje después de estimular las fibras paralelas a 0,05 Hz. La estimulación a 10 Hz durante 10 s indujo un incremento sostenido de la amplitud de las EPSCs en rodajas *Fmr1* KO mantenidas a 1 mM Ca^{2+} , aunque en estas mismas condiciones no se indujo LTP en las rodajas de WT. Los experimentos con rodajas KO para *Fmr1* se realizaron también en presencia del antagonista propranolol (100 μ M añadido 30 min antes de la inducción de la LTP). Los registros de las EPSCs representan la media de 6 EPSCs consecutivas a 0,05 Hz. (B) Para la cuantificación de los cambios en la amplitud de las EPSCs en rodajas WT y KO para *Fmr1* se promediaron 6 EPSCs consecutivas 30 min después de la inducción de la LTP (2) y se compararon con los valores respectivos antes de la estimulación (1). Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p<0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos basales.

La disminución en la frecuencia de los mEPSCs de las sinapsis *Fmr1* KO sugiere una reducción del tamaño del RRP, ya que según se ha visto en este trabajo la liberación espontánea se relaciona con el número de VSs que están en contacto con la membrana. Por ello, se estudió si el rescate de la LTP sensible a los β ARs por disminución de la $[Ca^{2+}]_e$ conlleva también la reducción del RRP basal y su aumento tras la inducción de la LTP. Los resultados muestran que a 1 mM Ca^{2+} el valor del RRP de las sinapsis PF-PC *Fmr1* KO es menor que el de los ratones WT a concentraciones normales de calcio, y que aumenta tras la inducción de la LTP ($4067,2 \pm 453,3$ pA, $n=12$ células, 5 ratones y $9192,7 \pm 927,8$ pA, $n=12$ células, 4 ratones antes y después de la estimulación respectivamente, $p=0,0002$, t de Student Figura 50A, B). Por lo tanto, la disminución del calcio extracelular corrige los cambios en la distribución de vesículas observados en ratones carentes de FMRP y rescata la LTP dependiente de los β ARs en las sinapsis de las fibras paralelas.

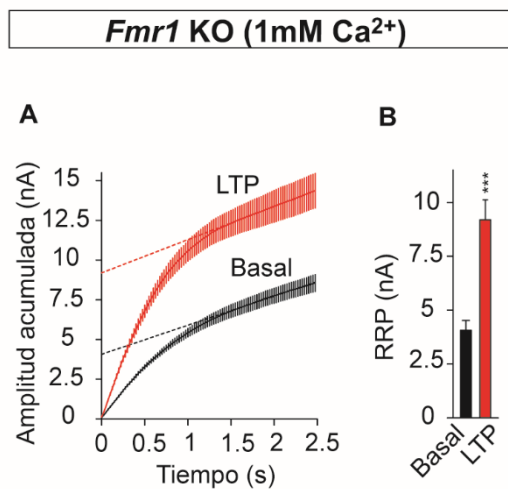


Figura 50. La reducción de la concentración de calcio extracelular reduce el tamaño del RRP y rescata el incremento inducido por la LTP en las sinapsis PF-PC de cerebelo carentes de la proteína FMRP.

(A) El tamaño del RRP se calculó partir de la intersección con el eje de ordenadas de la representación acumulada de la amplitud tras el estado estacionario inducido por un tren de pulsos de alta frecuencia (100 pulsos de 40 Hz) antes y 30 min después de la inducción de la LTP en rodajas de cerebelo de ratones *Fmr1* KO mantenidas con Ca^{2+} 1 mM. (B)

Cuantificación del tamaño del RRP. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p < 0,001$ (t de Student) comparados con datos basales.

3. Modulación dual de la liberación de glutamato por el receptor mGlu7.

mGlu7 es un receptor metabotrópico localizado mayoritariamente a nivel presináptico que ejerce un doble control sobre la liberación de neurotransmisor en las sinapsis excitadoras. La activación breve de este receptor pone en marcha un mecanismo de inhibición de la liberación de glutamato que afecta tanto a los terminales sinápticos que expresan canales de Ca^{2+} de tipo N (Millan *et al.*, 2002b; Millan *et al.*, 2003a) como de tipo P/Q (Martin *et al.*, 2007). En su acción inhibidora los receptores mGlu7 se acoplan a proteínas Gi/o para inhibir la adenilato ciclasa y la actividad de los VDCCs (Millan *et al.*, 2002a; Millan *et al.*, 2003a; Martin *et al.*, 2007). Se ha observado, no obstante, que una activación prolongada, acopla el receptor a otras vías de señalización dependientes de proteínas G insensibles a la toxina pertussis para activar la PLC (Perroy *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2010). Esta señalización genera diacilglicerol, transloca Munc13-1 y aproxima VSs (Martin *et al.*, 2010; Ferrero *et al.*, 2011; Ferrero *et al.*, 2013b; Martin *et al.*, 2018).

Aunque no se ha descrito la participación directa de este receptor en el FXS, se sabe que los receptores de glutamato están altamente relacionados con este síndrome, especialmente el receptor mGlu5 en relación con la llamada “teoría glutamatérgica del síndrome del X frágil” (Bear *et al.*, 2004; Lohith *et al.*, 2013), que describe un exceso de LTD postsináptica como consecuencia de una endocitosis exacerbada de los receptores AMPA. Asimismo, se sabe que en pacientes con este síndrome hay una mayor cantidad de receptor mGlu5 (Lohith *et al.*, 2013). También se ha observado que los receptores ionotrópicos de glutamato están implicados en este síndrome. La inhibición de los receptores NMDA es capaz de restaurar el exceso de LTD característica del FXS (Toft *et al.*, 2016). Además, en este síndrome se produce una mayor endocitosis de los receptores AMPA postsinápticos, así como una desregulación en su síntesis (Uzunova *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2017)

En los ratones *Fmr1* KO, se han observado alteraciones que podrían afectar la señalización y función de los receptores presinápticos que potencian la liberación de NT como es el caso del receptor mGlu7. Así, en neuronas corticales, FMRP se asocia de manera prominente con el ARNm de la diacilglicerol quinasa kappa (DGK κ) de manera que, en ausencia de FMRP, no se expresa la DGK κ y esto causa anormalidades en las espinas dendríticas y alteraciones en la plasticidad sináptica que podrían estar relacionados con los mayores niveles de DAG encontrados en los pacientes de FXS (Tabet *et al.*, 2016a; Tabet *et al.*, 2016b). Si estos cambios en los niveles de DAG ocurren a nivel presináptico podrían explicar la mayor colocación de VSs en contacto con la membrana que se ha encontrado en los ratones *Fmr1* KO (Deng *et al.*, 2011b) y la mayor liberación de neurotransmisor (Deng *et al.*, 2013). Además, se podría anticipar que la potenciación de la liberación por los receptores mGlu7 podría estar ocluida en los ratones FMRP KO.

Por último, cabe destacar que alteraciones en el gen que codifica para el receptor mGlu7 aparecen en individuos con autismo y con otras anomalías del desarrollo (Yang & Pan, 2013; Liu *et al.*, 2015; Noroozi *et al.*, 2016).

3.1. La inhibición por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por K⁺ 30mM no está alterada en sinaptosomas cerebrocorticales KO para *Fmr1*.

Se procedió, en primer lugar, a determinar la inhibición de la liberación de glutamato mediada por el receptor mGlu7 en sinaptosomas corticales de animales WT y *Fmr1* KO estimulados con K⁺ 30mM.

Los resultados indican que el agonista L-AP4 (1 mM) inhibe la liberación de glutamato en animales *Fmr1* KO ($3,55 \pm 0,22$ nmol/mg prot., n=14 y $2,57 \pm 0,15$ nmol/mg prot., n=14 en ausencia y en presencia de L-AP4, respectivamente, $p < 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 51B, C) en magnitud similar a la encontrada en los ratones WT ($4,14 \pm 0,26$ nmol/mg, n=16 y $2,73 \pm 0,17$ nmol/mg,

n=16 en ausencia y presencia de L-AP4, respectivamente, $p<0,001$, ANOVA con Bonferroni, Figura 51A, C) sin cambios significativos en las liberaciones control entre ambos genotipos ($p>0,05$, ANOVA con Bonferroni). Por lo tanto, la inhibición de la liberación de glutamato mediada por el receptor mGlu7 no parece estar alterada en ausencia de FMRP.

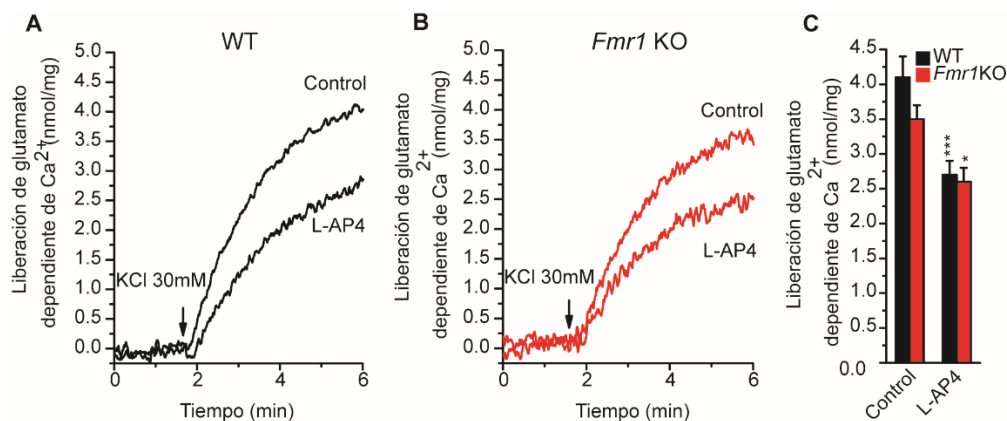


Figura 51. La inhibición por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por K⁺ 30 mM no está alterada en sinaptosomas cerebrocorticales KO para *Fmr1*.

(A, B) Promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por KCl 30 mM en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, (A) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del agonista de los mGluR del grupo III (L-AP4, 1 mM) añadido 1min antes que KCl. La liberación dependiente de Ca²⁺ es la diferencia entre la liberación en presencia de Ca²⁺ (1,33 mM) y en presencia de EGTA. (C) Diagrama que muestra el promedio de la liberación de glutamato en estas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). * $p<0,05$ *** $p<0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con los datos control.

3.2. La potenciación por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por K⁺ 5 mM se pierde en los sinaptosomas cerebrocorticales carentes de la proteína FMRP, aunque la expresión del receptor no está alterada.

La estimulación prolongada de los receptores mGlu7 activa una vía señalización que potencia la liberación de neurotransmisor (Martin *et al.*, 2010; Ferrero *et al.*, 2011; Ferrero *et al.*, 2013b; Martin *et al.*, 2018). En esta Tesis se ha mostrado la pérdida de la potenciación por β ARs de la liberación de

neurotransmisor en sinaptosomas *Fmr1* KO (apartados 2.1.1., 2.1.4. y 2.1.5.). Dado que las respuestas del receptor mGlu7 y los β ARs convergen en la activación de la PLC y que ambas requieren la movilización de VSs hacia la membrana de la zona activa, se planteó la posibilidad de que la potenciación de la liberación por mGlu7 también se perdiese en los sinaptosomas *Fmr1* KO.

En sinaptosomas corticales tratados con L-AP4 (1 mM, 10 min) se determinó la liberación de glutamato inducida por KCl 5 mM. Los resultados indicaron que la potenciación de la liberación de los sinaptosomas WT ($0,93 \pm 0,09$ nmol/mg, $n=9$ y $1,56 \pm 0,08$ nmol/mg, $n=9$, en ausencia y presencia de L-AP4, respectivamente, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni, Figura 52A, C), no tenía lugar en ratones *Fmr1* KO ($0,96 \pm 0,11$ nmol/mg, $n=15$ y $0,74 \pm 0,07$ nmol/mg, $n=15$, en ausencia y presencia de L-AP4, respectivamente, $p > 0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 52B, C). Por lo tanto, la ausencia de FMRP también previene la potenciación de la liberación de glutamato por el receptor mGlu7.

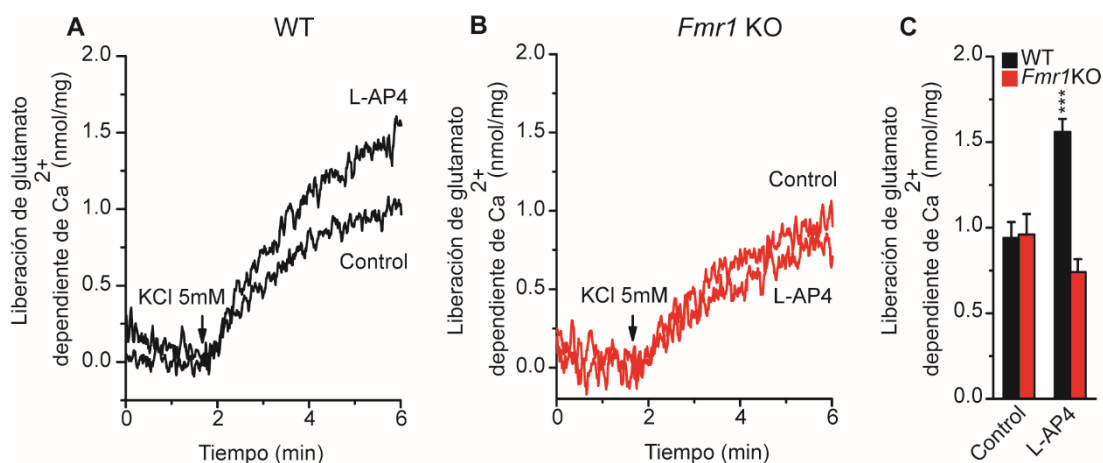


Figura 52. La potenciación por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por K⁺ 5mM se pierde en los sinaptosomas cerebrocorticales carentes de la proteína FMRP.

(A, B) Promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por KCl 5 mM en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, (A) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del agonista de los mGluR del grupo III (L-AP4, 100 μ M). El L-AP4 se incubó durante 10 min y posteriormente fue lavado. La liberación dependiente de Ca²⁺ se determinó como la diferencia entre la liberación en presencia de Ca²⁺ (1,33 mM) y con EGTA. (C) Diagrama que muestra el promedio de la liberación de glutamato en estas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p < 0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control.

Para descartar que un cambio en la expresión de los receptores mGlu7 pueda ser responsable de la pérdida de potenciación en los sinaptosomas *Fmr1* KO, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia con anticuerpos contra sinaptofisina y contra el receptor mGlu7. Los resultados mostraron que el receptor se expresa en el $27,6 \pm 1,6\%$ de los sinaptosomas WT (24 campos analizados, Figura 53A, C) y en el $28,0 \pm 1,1\%$ de los sinaptosomas *Fmr1* KO (25 campos analizados, Figura 53B, C). Por tanto, no hay cambios en la expresión de mGlu7 ($p=0,1928$, t de Student) asociados al genotipo *Fmr1* KO.

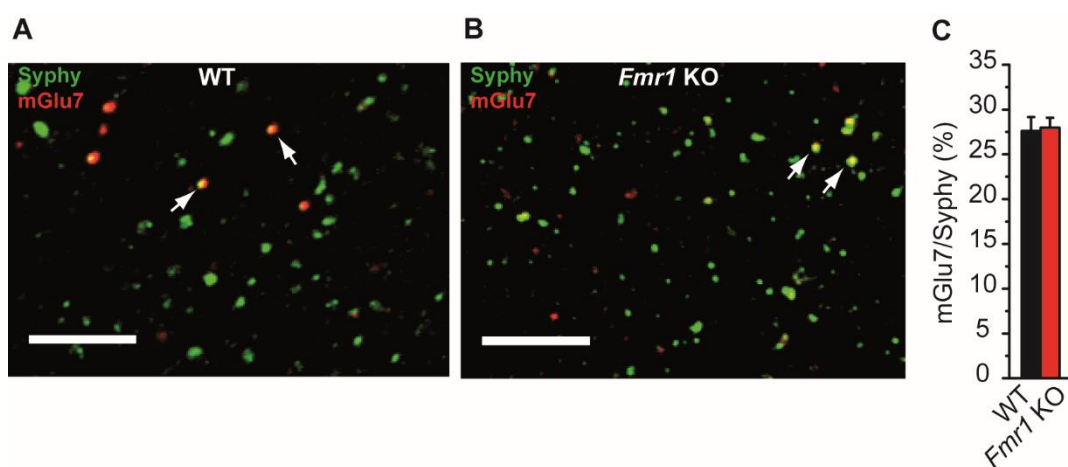


Figura 53. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la expresión del receptor mGlu7 en sinaptosomas cerebrocorticales.

(A, B) Inmunofluorescencia de sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, (A) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), fijados en cubreobjetos polilisina y teñidos con anticuerpos contra el receptor mGlu7 (1:250) y la proteína vesicular sinaptofisina (1:500). Barra de escala, 5 μ m. (C) Cuantificación de la expresión del receptor mGlu7 en sinaptosomas WT y *Fmr1* KO frente a los marcados con sinaptofisina. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). No significativo, $p>0,05$ (t de Student) comparado con sinaptosomas WT.

3.3. La disminución de la concentración de Ca^{2+} extracelular no rescata la potenciación por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por K^+ 5mM

Como se ha visto previamente, la disminución de la concentración extracelular de Ca^{2+} a 0,1 mM rescata la potenciación por los β ARs de la liberación espontánea en sinaptosomas de corteza y en rodajas de cerebelo, así

como la LTP en las sinapsis PF-PC de los ratones *Fmr1* KO (apartados 2.1.8., 2.2.5. y 2.2.6.). Por ello, se planteó la posibilidad de que esta estrategia pudiera rescatar, también, la potenciación por mGlu7 de la liberación inducida por KCl 5 mM. Los resultados indicaron que, paradójicamente, la disminución del calcio a 0,5 mM incrementa la liberación control del glutamato hasta ($1,48 \pm 0,05$ nmol/mg prot., $n=8$, $p<0,01$ ANOVA con Bonferroni), y ocluye la potenciación por L-AP4 (1 mM) ($1,51 \pm 0,08$ nmol/mg prot., $n=6$, $p>0,05$ ANOVA con Bonferroni) en los sinaptosomas WT. En los ratones *Fmr1* KO la bajada de $[Ca^{2+}]_e$ produjo solo un ligero incremento de la liberación ($1,21 \pm 0,07$ nmol/mg prot., $n=7$, $p>0,05$, ANOVA con Bonferroni), sobre la que L-AP4 no indujo potenciación alguna ($1,24 \pm 0,09$ nmol/mg prot., $n=6$, $p>0,05$, ANOVA con Bonferroni, Figura 54).

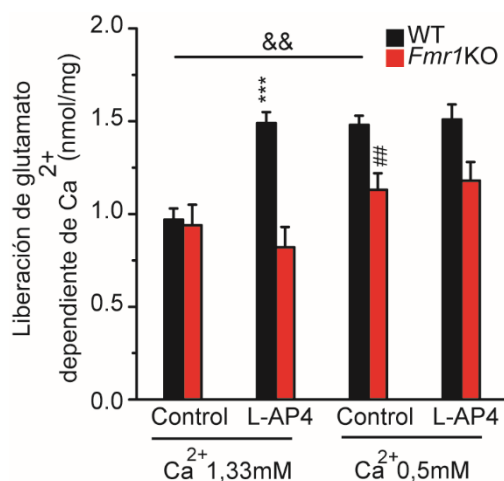


Figura 54. La potenciación por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por K^+ 5 mM no se recupera disminuyendo la concentración del calcio extracelular en ausencia de FMRP y desaparece en el genotipo silvestre.

(A) Potenciación de la liberación de glutamato inducida por el agonista de los mGlus del grupo III L-AP4 (1 mM) en sinaptosomas corticales de animales genotipo silvestre, WT, y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, en condiciones de Ca^{2+} extracelular de 1,33 mM y 0,5 mM ante un estímulo de KCl 5 mM. El L-AP4 se incubó durante 10min y posteriormente fue lavado. El calcio se incorporó 2-3 min antes del inicio del registro.

Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p<0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control. ## $p<0,01$ (ANOVA con Bonferroni) comparados entre animales WT y *Fmr1* KO. && $p<0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados entre controles a distintas concentraciones de Ca^{2+} .

Estos resultados indican que la disminución del calcio extracelular no parece ser una estrategia idónea para el rescate de la liberación inducida KCl 5 mM. Una posible explicación a esta paradoja de más liberación de glutamato al disminuir la concentración de Ca^{2+} podría estar en el papel de los canales de K modulados por Ca^{2+} (BK del inglés *Big potassium (K) channels*). Estos canales se regulan tanto por voltaje como por calcio, y su activación contribuye a la

repolarización de los botones sinápticos limitando la entrada de Ca^{2+} (Wang, 2008). Es probable que la disminución del Ca^{2+} extracelular prevenga la activación de estos canales, lo que llevaría a una mayor liberación de neurotransmisor. Este efecto estaría aminorado en las sinapsis *Fmr1* KO ya que la ausencia de la proteína FMRP mantendría este canal cerrado independientemente de la concentración de calcio intracelular (Deng *et al.*, 2013; Deng & Klyachko, 2016).

3.4. La potenciación por el receptor mGlu7 de la liberación de glutamato inducida por ionomicina no se pierde en los sinaptosomas cerebrocorticales que carecen de la proteína FMRP.

Las sinapsis *Fmr1* KO tienen más vesículas en las proximidades de la membrana en condiciones basales. Aunque en este trabajo no se ha determinado si L-AP4 falla en la movilización de más vesículas a la membrana como ocurre con isoproterenol, una posibilidad es que la estimulación con KCl 5 mM agote las VSs disponibles. Por ello, se estudió si los receptores mGlu7 potencian la liberación inducida por un estímulo más débil como el que proporciona el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina. Con este estímulo, el agonista L-AP4 (1 mM) indujo una potenciación de la liberación de neurotransmisor en los sinaptosomas *Fmr1* KO ($0,50 \pm 0,01$ nmol/mg prot., $n=18$ y $1,04 \pm 0,03$ nmol/mg prot., $n=18$ en ausencia y en presencia de L-AP4 respectivamente, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni, Figura 55B, C), similar a la encontrada en los sinaptosomas WT ($0,49 \pm 0,02$ nmol/mg, $n=14$ y $1,09 \pm 0,04$ nmol/mg, $n=14$ en ausencia y presencia de L-AP4 respectivamente, $p < 0,001$, ANOVA con Bonferroni, Figura 55A, C). Luego, con un estímulo débil se preserva la potenciación de la liberación por el receptor mGlu7 en ausencia de la proteína FMRP.

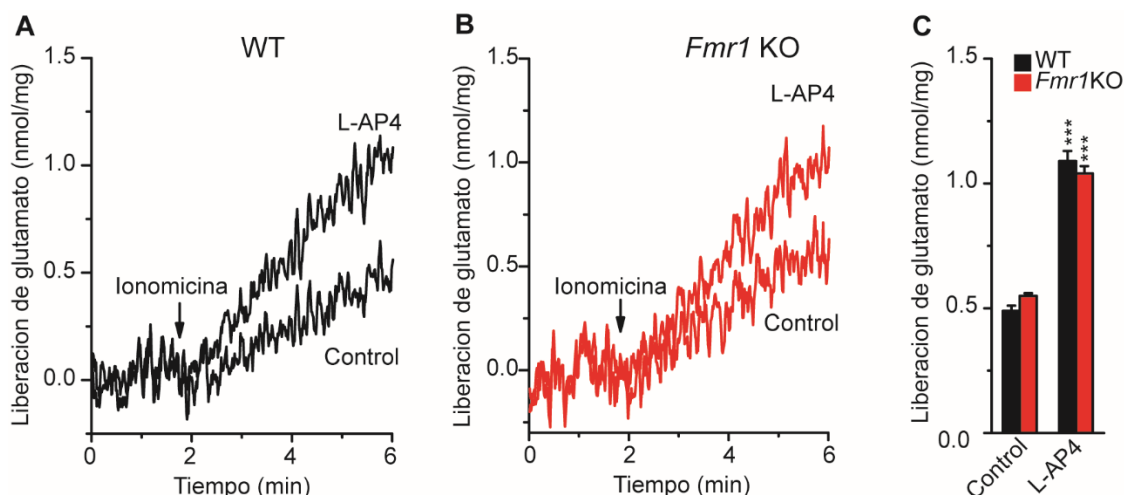


Figura 55. La potenciación por el receptor mGluR7 de la liberación de glutamato inducida por ionomicina no se pierde en los sinaptosomas cerebrocorticales que carecen de la proteína FMRP.

(A, B) promedio de registros de la liberación de glutamato inducida por ionomicina (0,5-2 μ M) en sinaptosomas de corteza cerebral de genotipo silvestre, WT, (A) y carentes de la proteína FMRP, *Fmr1* KO, (B), en ausencia y en presencia del agonista de los mGluR del grupo III L-AP4 (1 mM), que fue incubado durante 10 min y posteriormente lavado. Todos los experimentos se realizaron en presencia de TTx (1 μ M) añadida 2-3min antes del inicio del registro. (C) Promedio de la liberación de glutamato en dichas condiciones. Los datos se expresaron como la media \pm SEM (barras de error). *** $p < 0,001$ (ANOVA con Bonferroni) comparados con datos control.

Por lo tanto, y a la vista de los resultado obtenidos, se puede afirmar que en la sinapsis *Fmr1* KO existe una pérdida de potenciación de la liberación de glutamato mediada por los receptores β adrenérgicos y los mGlu7 asociada a una alteración en la distribución de las VSs en la membrana de la zona activa que se hace patente bajo estímulos moderados de KCl 5 mM. Además, se ha observado una menor eficacia del AMPc generado por los β ARs para activar la vía que induce la potenciación de la liberación de glutamato, lo cual se pone de manifiesto mediante la incapacidad del isoproterenol para incrementar la liberación del neurotransmisor incluso con estímulos débiles con ionomicina. Sin embargo, esta falta de eficacia del segundo mensajero no se traslada al DAG generado por mGlu7, por lo que se puede concluir que dicha alteración es exclusiva de los β ARs. Asimismo, esta alteración de los β ARs podría ser responsable de la ausencia de LTP observada en las sinapsis PF-PC de cerebelo.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN:

En esta Tesis Doctoral se han encontrado dos alteraciones en las sinapsis glutamatérgicas carentes de la proteína FMRP que podrían explicar algunas de las disfunciones cerebrales asociadas al síndrome del X frágil:

-La primera es la existencia de un mayor número de vesículas sinápticas en contacto con la membrana de la zona activa y la incapacidad del agonista de los receptores β AR, isoproterenol, para incrementar este número (Figura 56). Esto explica: (i) el fallo de isoproterenol y de otros activadores de la vía de señalización del receptor (activador de la adenilato ciclasa, forskolina y activador de las proteínas Epac, 8-pCPT) a la hora de potenciar la liberación de glutamato inducida por una estimulación moderada de los sinaptosomas con KCl 5 mM. (ii) El aumento de la liberación espontánea observado en sinaptosomas y en las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje (PF-PC). (iii) La falta de LTP presináptica en las sinapsis entre PF-PC y su rescate cuando se reduce la concentración extracelular de Ca^{2+} .

-La segunda alteración es la existencia de una baja eficacia del AMPc generado por el β AR para activar la vía de señalización que potencia la liberación de glutamato (Figura 56). Esto se puso de manifiesto en experimentos en los que se recurrió a estimulaciones más débiles de los sinaptosomas como las producidas por el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina. En este caso, tanto forskolina como 8-pCPT potenciaron la liberación, pero no, isoproterenol que, sin embargo, sí lo hizo en presencia del inhibidor de la fosfodiesterasa de nucleótidos PDE2A BAY 60-7550.

A la vista de estos resultados, se podría afirmar que, tanto los agonistas de los receptores presinápticos de las fibras paralelas que reducen la entrada de Ca^{2+} , como el inhibidor de la fosfodiesterasa PDE2A BAY 60-7550, podrían usarse como herramientas para reestablecer las modulaciones de la liberación y plasticidad sinápticas perdidas en el síndrome de X frágil, lo que las convierte

en potenciales dianas terapéuticas para abordar las disfunciones de este síndrome.

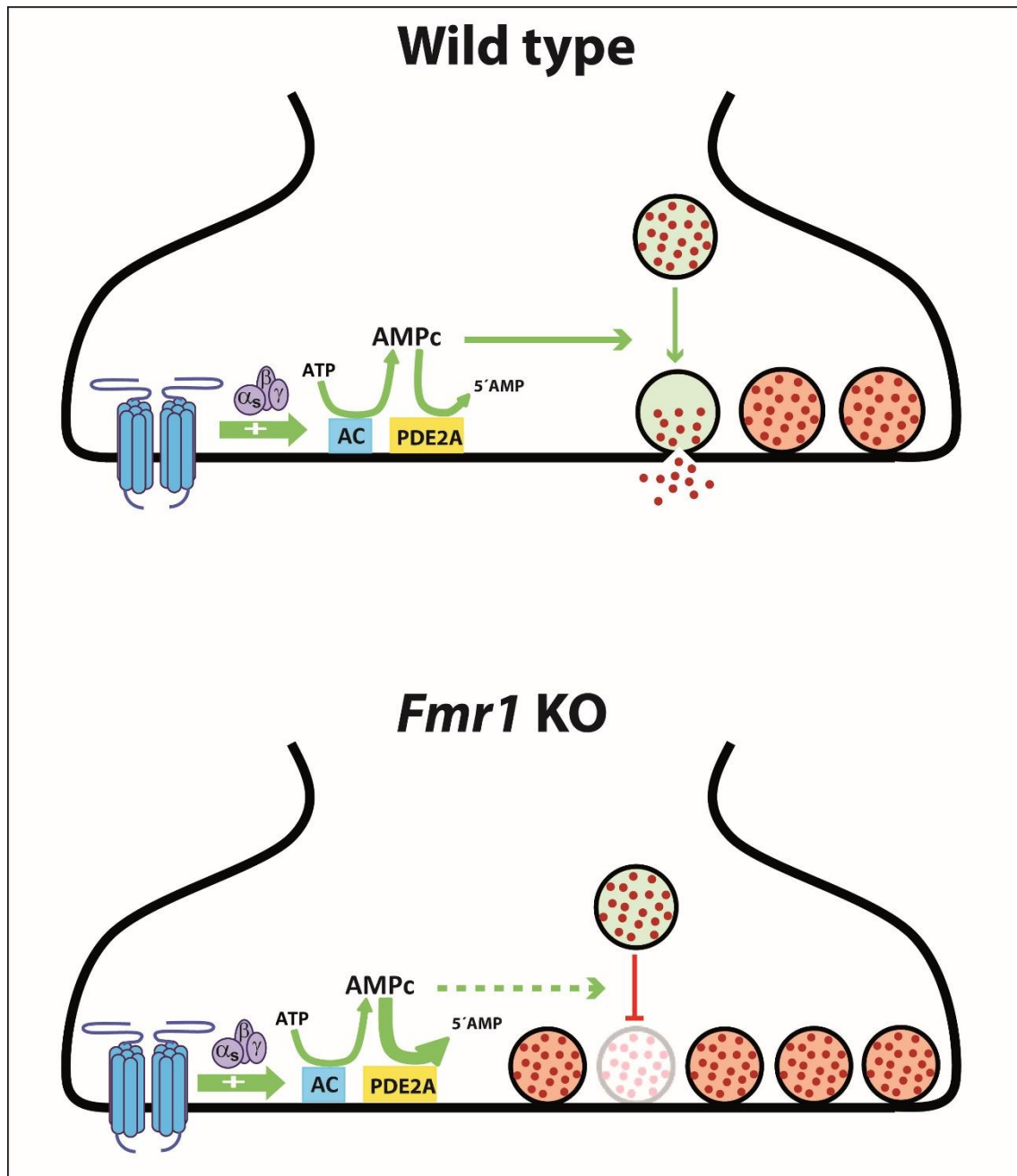


Figura 56. Alteraciones encontradas en terminales sinápticos *Fmr1* KO.

En terminales sinápticos procedentes de ratones WT, la activación de los β ARs resulta en una potenciación de la liberación de glutamato asociada a un aumento en el número de VSs amarradas a la membrana de la zona activa. Los terminales sinápticos de ratones *Fmr1* KO presentan un mayor número de VSs amarradas en condiciones basales y la activación de los β ARs no incrementa este número, por lo que la potenciación de la liberación de glutamato no tiene lugar a pesar de que los niveles de AMPc no varían. Esto se debe a una falta de eficacia del AMPc para activar la vía, quizá debida a un exceso de degradación del mismo por parte de la PDE2A.

1. Funciones presinápticas de FMRP.

El ARNm de FMRP se localiza en espinas y dendritas y es traducido en respuesta a la estimulación de los receptores metabotrópicos de glutamato de tipo 1 (mGlu1). FMRP es, pues, un regulador de la traducción inducida por la actividad en la sinapsis (Brown *et al.*, 2001). Buena parte de la investigación de FMRP se ha centrado en el estudio de sus funciones postsinápticas, a pesar de que esta proteína se expresa también en estructuras presinápticas (Antar *et al.*, 2006; Christie *et al.*, 2009; Till *et al.*, 2012) y sus ARNms diana codifican un tercio del proteoma presináptico (Darnell *et al.*, 2001).

Algunas funciones de FMRP afectan a la morfología de la presinapsis. En cultivos neuronales se ha encontrado que la proteína FMRP modula la capacidad de una neurona para establecer conexiones con neuronas vecinas (Hanson & Madison, 2007), la dinámica del cono de crecimiento (Antar *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009) y la morfología y crecimiento axonales (Morales *et al.*, 2002; Bureau *et al.*, 2008).

Asimismo, se han descrito numerosas acciones de FMRP que regulan la función presináptica. FMRP interacciona con la subunidad $\beta 4$ de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (canales BK) que participan en la repolarización del potencial de acción. De ahí que, en ausencia de FMRP, los potenciales de acción sean más largos y haya una mayor entrada de Ca^{2+} y que esto afecte a la liberación del neurotransmisor (Klemmer *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2013). La proteína FMRP también interacciona con los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, de tal manera que su ausencia provoca una alteración tanto de los niveles basales de calcio, como de la entrada del mismo tras la despolarización por sustitución de los canales de tipo P/Q por canales del tipo N (Castagnola *et al.*, 2018). Además, regula la degradación de los canales de calcio de tipo N en el proteasoma y, consecuentemente, su expresión en la superficie celular (Ferron *et al.*, 2014). FMRP también participa en la modulación estructural de las sinapsis. Las sinapsis hipocámpales de los animales Fmr1 KO tienen zonas activas más pequeñas y una mayor tendencia a presentar un aumento en el

número de VSs en contacto con la membrana, lo que afecta a la plasticidad sináptica a corto plazo (Klemmer *et al.*, 2011). Asimismo, se ha observado una menor facilitación por pulsos pareados, como consecuencia de la mayor probabilidad de liberación, que también contribuye al fenotipo presináptico de este síndrome (Klemmer *et al.*, 2011).

Existen mutaciones de FMRP, como la R138Q que está asociada a un retraso en el desarrollo en varones, que no implican la existencia de repeticiones del triplete CGG y que permiten disociar las acciones pre y postsinápticas de la proteína. Esta mutación parece preservar las funciones postsinápticas de FMRP como son: su capacidad de unión al ARNm, la modulación de la síntesis de proteínas y del tráfico de los receptores AMPA. Sin embargo, la mutación da lugar a defectos en la función presináptica como las alteraciones estructurales de la unión neuromuscular y el alargamiento de los potenciales de acción por hipofunción de los canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ (BK) (Myrick *et al.*, 2015).

Por tanto, todos estos datos confirman la existencia de un fenotipo presináptico en el síndrome del X frágil.

2. Potenciación de la liberación de glutamato por los β ARs y distribución de VSs en la corteza.

En este trabajo se ha observado que la potenciación de la liberación de glutamato inducida por el agonista del β AR se pierde en condiciones de estimulación moderada (KCl 5 mM) de los sinaptosomas corticales *Fmr1* KO (Figura 22). Los experimentos de inmunofluorescencia muestran que la ausencia de la proteína FMRP no produce cambios en la expresión del receptor, al menos en el compartimento presináptico, aunque el receptor tiene una mayor tendencia a expresarse en terminales que contienen Munc 13-2 (Figuras 23 y 24). Tampoco se observan cambios en la generación de AMPc (Figura 25). Además, la potenciación se pierde al estimular la vía con el activador de la adenilato ciclasa forskolina (Figura 26). Por tanto, el fallo de la potenciación de la

liberación de glutamato por el agonista del β AR podría tener lugar en alguna etapa de la vía de señalización posterior a la síntesis del AMPc.

La potenciación de la liberación por isoproterenol requiere la activación de la proteína Epac (Ferrero *et al.*, 2013a) que constituye una diana del AMPc alternativa a la PKA y que participa en la liberación de neurotransmisor (Huang & Hsu, 2006; Gekel & Neher, 2008; Ferrero *et al.*, 2013a; Fernandes *et al.*, 2015). Sin embargo, la activación de las proteínas Epac con 8-pCPT tampoco es capaz de rescatar la potenciación de la liberación en sinaptosomas *Fmr1* KO (Figura 27), lo que sugiere que la alteración podría ocurrir en alguna etapa distal del receptor a nivel de la maquinaria exocitótica.

La potenciación de la liberación de neurotransmisor por los β AR se asocia a un incremento en el número de vesículas sinápticas ancladas o en contacto con la membrana plasmática (Ferrero *et al.*, 2013a). Puesto que el número de VSs en contacto con la membrana está ya incrementado basalmente en las sinapsis *Fmr1* KO de hipocampo, se planteó si esto podría representar un techo para la liberación. Efectivamente, los experimentos de microscopía electrónica muestran una distribución alterada con más vesículas próximas a la membrana en las sinapsis *Fmr1* KO de la corteza cerebral en comparación con las sinapsis WT. Además, la activación de los receptores β AR con isoproterenol no incrementa más la aproximación de VSs a la membrana (Figura 28).

El número de VSs en contacto con la membrana se correlaciona con el tamaño del RRP, que representa el subconjunto de VSs que están preparadas para la fusión (Rosenmund & Stevens, 1996; Schikorski & Stevens, 2001). Además, el tamaño del RRP es un determinante importante de la fuerza sináptica junto a la probabilidad de liberación (Thanawala & Regehr, 2013). Este resultado es compatible con la mayor liberación espontánea de las sinapsis *Fmr1* KO observada en presencia del bloqueante de canales de Na^+ tetrodotoxina. Esta liberación basal, en ausencia de estímulo, resulta, principalmente, de la fusión espontánea de una VS que ocurre a concentraciones basales de Ca^{2+} y, en menor medida, de la apertura estocástica

de un canal de Ca^{2+} (Kaeser & Regehr, 2014). Por tanto, este parámetro refleja el número de vesículas próximas a la membrana. Luego, el incremento de las VSs en contacto con la membrana contribuye a la mayor liberación de neurotransmisor en las sinapsis *Fmr1* KO (Deng *et al.*, 2013).

3. Potenciación de la transmisión sináptica por los β ARs y distribución de VSs en cerebelo.

En este trabajo se estudió la transmisión sináptica entre las fibras paralelas y las células de Purkinje del cerebelo con el fin de averiguar si el fenotipo presináptico observado en la corteza cerebral se reflejaría en otro tipo de sinapsis. Específicamente, se deseaba conocer si la ausencia de FMRP afectaba a la liberación espontánea y a la distribución de VSs en estas sinapsis cerebelares y si el incremento de estos parámetros inducido por estimulación de los β ARs estaba alterado. Por ello, los experimentos de electrofisiología se hicieron en paralelo a los de liberación de glutamato en sinaptosomas de cerebelo que, aunque heterogéneos, deben contener una buena representación de los botones sinápticos de las células granulares, ya que estas neuronas son las más abundantes y suponen más de la mitad de las neuronas del SNC (Andersen *et al.*, 1992). La preparación de sinaptosomas de cerebelo ha facilitado algunas determinaciones que son más complicadas en las rodajas. Por ejemplo, ha permitido descartar cambios en la expresión del receptor o en la generación de AMPc como responsables de la falta de potenciación de las sinapsis *Fmr1* KO del cerebelo.

Cabe mencionar el sorprendente paralelismo entre los datos obtenidos con las dos preparaciones, lo que, sin duda, refuerza las conclusiones. La liberación espontánea de glutamato de los sinaptosomas de cerebelo, así como la frecuencia de las mEPSC de las sinapsis PF-PC de los animales *Fmr1* KO, fueron más altas que en los ratones WT y, en ambos casos, no se incrementó con isoproterenol (Figuras 41 y 44). Los experimentos de microscopía electrónica en las rodajas de cerebelo mostraron que las sinapsis PF-PC *Fmr1* KO tenían mayor

número de VSs en contacto con la membrana plasmática y que el isoproterenol no incrementaba este número, en contraste con lo que ocurre en las sinapsis WT (Figura 45). Esto explica por qué las respuestas de potenciación están ocluidas en ambas preparaciones y confirma que el fenotipo de amarre o *docking* encontrado en las sinapsis *Fmr1* KO corticales se manifiesta también en otras áreas cerebrales.

El establecimiento de contacto físico entre las VSs y la membrana plasmática de la zona activa parece depender de la formación de dos complejos proteicos: el de las proteínas Munc13-RIM1-Rab3 (Dulubova *et al.*, 2005) y el ensamblaje del complejo SNARE entre las proteínas SNAP-25, sinaptobrevina y syntaxina, que es esencial para la fusión de las VSs (Chen *et al.*, 1999) y que proporciona un amarre fuerte de las vesículas a la membrana plasmática. El ensamblaje del complejo SNARE es iniciado por la proteína Munc13 que promueve la conformación abierta de la syntaxina y la exposición de su dominio SNARE capaz ahora de interactuar con los dominios SNARE de las otras proteínas del complejo (Ma *et al.*, 2011). El papel central de la proteína Munc13 en la colocación de las VSs en contacto con la membrana está subrayado por el hallazgo de que las neuronas deficientes en estas proteínas exhiben menos VSs ancladas a la membrana (Imig *et al.*, 2014). En las preparaciones cerebrales, la mayor parte de la proteína Munc13 se encuentra unida a membranas y una cantidad menor está en la fracción soluble, aunque esta distribución puede variar según las isoformas (Brose *et al.*, 1995; Augustin *et al.*, 1999). La proteína soluble es traslocada/activada por los esteres de forbol y por el DAG generado por estimulaciones de alta frecuencia (Brose & Rosenmund, 2002; Rhee *et al.*, 2002; Rosenmund *et al.*, 2002) o por la activación de receptores acoplados a la generación de DAG (Martin *et al.*, 2010; Ferrero *et al.*, 2013a).

Es razonable pensar que los niveles elevados de DAG (Tabet *et al.*, 2016a) y de la concentración citoplasmática de calcio, $[Ca^{2+}]_c$, (Deng *et al.*, 2013) de las sinapsis *Fmr1* KO podrían contribuir al mayor número de VSs colocadas cerca de la membrana como consecuencia de una mayor actividad de Munc13. Esta

proteína está regulada, no sólo por la unión de DAG al dominio C1, (Betz *et al.*, 1998) sino, también, por la unión de Ca^{2+} /CaM (Dimova *et al.*, 2006; Dimova *et al.*, 2009) y de Ca^{2+} /fosfolípidos (Shin *et al.*, 2010). Por tanto, entender los factores que contribuyen a aumentar las VSs que están amarradas a la membrana es esencial para poder proponer estrategias farmacológicas para restaurar la distribución de la VSs y la potenciación de la liberación mediada por los β ARs.

En el FXS el metabolismo del DAG está alterado porque FMRP une el ARNm de la diacilglicerol quinasa kappa que, a su vez, regula la conversión de DAG en ácido fosfatídico. En las sinapsis *Fmr1* KO se pierde la expresión de la DAGK κ y se incrementa el DAG. La falta de DAGK κ se asocia a alteraciones en la plasticidad sináptica y en el comportamiento y estas funciones son rescatadas mediante la sobreexpresión del enzima (Tabet *et al.*, 2016a).

Se han descrito varias alteraciones en la dinámica del calcio celular que, conjuntamente, contribuyen a un incremento en la concentración de este ion. Así, en las sinapsis CA3-CA1 del hipocampo sometidas a una estimulación repetida se ha observado que la ausencia de FMRP produce un alargamiento de los potenciales de acción y un aumento de la entrada de Ca^{2+} y de la liberación de neurotransmisor (Deng *et al.*, 2013). Esta acción es consecuencia de una hipofunción de los canales de K^{+} activados por Ca^{2+} , ya que la proteína FMRP modula estos canales por una interacción directa con la subunidad $\beta 4$, lo que constituye un ejemplo de una modulación de la proteína FMRP que es independiente de la síntesis de proteínas. Estos cambios tienen lugar, igualmente, en las neuronas piramidales corticales (Deng *et al.*, 2013). La proteína FMRP también interacciona con los VDCCs. En neuronas en cultivo, la ausencia de FMRP altera el estado estacionario y la entrada de Ca^{2+} inducida por despolarización como consecuencia de la sustitución de parte de los canales de tipo P/Q por canales del tipo N (Castagnola *et al.*, 2018). FMRP regula, además, la degradación de los canales de calcio de tipo N en el proteasoma y, consecuentemente, su expresión en la superficie celular. Así, en neuronas de la

raíz dorsal, la ausencia de FMRP incrementa la densidad de canales de calcio de tipo N en las terminaciones sinápticas e incrementa la exocitosis (Ferron *et al.*, 2014). En consonancia con estos datos, en este trabajo se ha encontrado que la estimulación con KCl 10mM produce una mayor entrada de calcio en los terminales sinápticos corticales de ratones carentes de FMRP (Figura 39). Este estímulo permite la generación de potenciales de acción, por lo que es posible que este aumento de la entrada de calcio esté relacionado con el alargamiento de los potenciales de acción observado en ratones *Fmr1* KO (Deng *et al.*, 2013).

4. La disminución de $[Ca^{2+}]_e$ rescata algunas funciones.

Si el fenotipo de *docking* de las sinapsis *Fmr1* KO es debido a una mayor actividad de la proteína Munc13 por los elevados niveles de DAG y Ca^{2+} , la disminución de la concentración extracelular de Ca^{2+} debería revertir el fenómeno. La bajada de Ca^{2+} (a 0,1 mM en sinaptosomas y a 1 mM en las rodajas de cerebelo) rescata algunas de las funciones perdidas: (i) Reduce la liberación espontánea de glutamato al nivel de los ratones WT y rescata su potenciación por isoproterenol en sinaptosomas *Fmr1* KO corticales (Figura 40). (ii) Reduce la frecuencia de las mEPSC al nivel de la de los ratones WT y rescata su potenciación por isoproterenol en las sinapsis PF-PC *Fmr1* KO de cerebelo (Figura 48). (iii) Reduce el tamaño del RRP de las sinapsis PF-PC *Fmr1* KO de cerebelo al nivel del de los animales WT (Figura 50). (iv) Seguramente, como consecuencia del rescate de la potenciación de la transmisión por los β AR, se rescata también la LTP de las fibras paralelas que requiere la activación de estos receptores (ver más adelante).

Puesto que la disminución de la $[Ca^{2+}]_e$ reestablece algunas funciones presinápticas, incluida la LTP de las fibras paralelas, esto abre la posibilidad de un rescate de estas funciones por medio de herramientas farmacológicas que reduzcan la entrada de Ca^{2+} en los botones sinápticos de las fibras paralelas. Los receptores acoplados a proteínas G reducen la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje como, por ejemplo, los receptores de

cannabinoides CB1, que deprimen la transmisión sináptica excitadora en los botones sinápticos de la fibras paralelas porque disminuyen la probabilidad de liberación (Levenes *et al.*, 1998). Dado que la síntesis de endocannabinoides en esta sinapsis depende de los receptores mGlu1 postsinápticos, los agonistas de estos receptores deberían aumentar la producción de cannabinoides e inhibir los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Maejima *et al.*, 2005). Otros GPCRs que inhiben los canales de Ca^{2+} en estas sinapsis son los receptores mGlu4, GABAB y adenosina A1 (Le Guen & De Zeeuw, 2010) y, por tanto, agonistas de estos receptores deberían reducir la entrada de Ca^{2+} en los botones sinápticos de las fibras paralelas. Estos experimentos se están realizando en la actualidad en este laboratorio.

5. Los inhibidores de la fosfodiesterasa PDE2A rescatan la potenciación de la liberación por los β ARs.

La pérdida de la potenciación por isoproterenol podría radicar en el hecho de que, incluso una estimulación moderada como la de 5 mM KCl, causaría una depleción o agotamiento del RRP, que, es sabido, representa solo una fracción del componente reciclable de las vesículas sinápticas (Rizzoli & Betz, 2005) y que, además, en las sinapsis *Fmr1* KO no se incrementa con isoproterenol. Por ello, se utilizó una estimulación más débil con el ionóforo de Ca^{2+} ionomicina, que se inserta en la membrana y permite la entrada de Ca^{2+} al interior celular induciendo la liberación vesicular de glutamato. Reduciendo la liberación inducida por ionomicina a 0,5-0,7 nmoles de glutamato, se observó el rescate de la potenciación de la liberación con el activador de la adenilato ciclasa forskolina (Figura 31) y con el activador de las proteínas Epac 8-pCPT (Figura 32), pero no con el agonista β AR isoproterenol (Figura 30). Por tanto, la pérdida de la potenciación por isoproterenol en los experimentos con KCl refleja la incapacidad del receptor β AR de movilizar VSs hacia la membrana, mientras que en los experimentos con ionomicina reflejan la falta de eficacia del

AMPC generado por los β ARs para activar la vía de señalización o la insensibilidad de la vía de señalización a concentraciones más bajas de AMPc.

Es importante tener en cuenta que este problema de eficacia no se observa cuando el AMPc se genera con forskolina, porque este compuesto induce un aumento de AMPc mucho mayor que isoproterenol (Figura 25). Nótese también que este problema de eficacia en la vía de señalización no se observa para el receptor mGlu7, ya que la estimulación débil con ionomicina recupera la potenciación de la liberación con el agonista L-AP4 (Figura 55).

Dado que la generación de AMPc por el β AR no está alterada en los sinaptosomas *Fmr1* KO en comparación con los WT, la falta de eficacia del AMPc para activar la potenciación se podría atribuir a una degradación más rápida del AMPc por las fosfodiesterasas (Maurin *et al.*, 2018b). El hecho de que la potenciación por isoproterenol se reestablezca con el inhibidor de fosfodiesterasas de amplio espectro IBMX (Figura 34) y con el inhibidor específico de la PDE2A BAY 60-7550 (Figura 35), pero no con el inhibidor específico de PDE4 rolipram (Figura 37), apunta a una mayor degradación del AMPc por PDE2A como la causa de la falta de potenciación por isoproterenol. Hay que tener en cuenta que una degradación más rápida del AMPc en las sinapsis *Fmr1* KO estaría enmascarada en el ensayo de AMPc dado que en este se incluye siempre IBMX (Figura 25).

Hay varias razones para pensar que la PDE2A controla la vida media del AMPc en el entorno de los receptores β AR en los botones glutamatérgicos corticales: (i) PDE2A tiene una fuerte expresión en las neuronas piramidales de la corteza cerebral (Stephenson *et al.*, 2012) y se localiza en la zona activa presináptica asociada a las vesículas que están en contacto con la membrana presináptica (Boyken *et al.*, 2013) donde también se localizan los β ARs (Ferrero *et al.*, 2013a). (ii) El ARNm de la PDE2A es una diana prominente de la proteína FMRP (Maurin *et al.*, 2018a) y, como consecuencia, los niveles de la proteína PDE2A son más altos en las sinapsis *Fmr1* KO corticales (Tang *et al.*, 2015). (iii) La actividad de PDE2A también es más alta en las sinapsis *Fmr1* KO donde el

AMPC se degrada más rápidamente que en la neuronas WT (Maurin *et al.*, 2018b). Por tanto, una desregulación de la PDE2A podría ser responsable de la pérdida de potenciación de la liberación por los receptores β adrenérgicos.

El GMPc es un activador de la PDE2A y esta activación se puede inducir con un donador de óxido nítrico (NO) que active la guanilato ciclasa e incremente los niveles de GMPc. El GMPc se une a uno de los dominios GAF de PDE2A e induce un cambio conformacional, incrementando la actividad enzimática para el AMPc hasta 6 veces (Zhang, 2015). Se ha encontrado que el donador de NO DEANO anula la potenciación por isoproterenol de la liberación en sinaptosomas WT (Figura 36). Por tanto, DEANO recrea en las sinapsis WT la ineficacia del AMPc para activar la vía de señalización encontrada en las sinapsis *Fmr1* KO. Se desconoce si esta modulación de la actividad PDE2A por GMPc opera en las sinapsis *Fmr1* KO *in vivo*. La PDE2A degrada tanto AMPc como GMPc y, de hecho, basalmente tiene más afinidad por este último nucleótido. Dado que hay más proteína PDE2A en las sinapsis *Fmr1* KO (Tang *et al.*, 2015), cabe esperar niveles bajos de ambos nucleótidos, incluso más bajos para GMPc, lo que haría poco probable la activación de PDE2A por GMPc.

La inhibición de PDE2A con BAY 60-7550 rescata otras funciones presinápticas de FMRP como es el control del crecimiento axonal (Maurin *et al.*, 2018b). PDE2A también se localiza a nivel postsináptico y su inhibición farmacológica rescata la madurez de las espinas dendríticas y la LTD dependiente de mGlu exagerada que se observa en el hipocampo de los ratones que carecen de la proteína FMRP (Maurin *et al.*, 2018b). Otro nexo entre la actividad de la fosfodiesterasa y el síndrome del X frágil es el hecho de que el inhibidor IBMX, pero no el inhibidor de PDE4 rolipram, rescate el procesamiento sensorial observado en los mutantes del síndrome del X frágil de *Drosophila* (Androschuk *et al.*, 2018).

La inhibición de PDE2A rescata la potenciación con isoproterenol cuando los sinaptosomas se estimulan débilmente con ionomicina, pero no cabe pensar

que esto resuelva el problema del exceso de VSs amarradas a la membrana responsable de la oclusión de algunas respuestas y de la pérdida de potenciación cuando se estimulan moderadamente las sinapsis *Fmr1* KO con KCl. Así se ha determinado en este grupo que la disminución de los niveles de AMPc producida por la activación prolongada de los receptores CB1 con cannabinoides produce el efecto contrario, esto es, el silenciamiento sináptico (Ramirez-Franco *et al.*, 2014) por retirada de las VSs de las proximidades de la membrana plasmática en la zona activa (Alonso *et al.*, 2017). No obstante, cabe la posibilidad de que el aumento de los niveles de AMPc por inhibición de la PDE2A promueva la creación de nuevos sitios de liberación o active sitios previamente silentes (Chavis *et al.*, 1998; Moulder *et al.*, 2008; Ramirez-Franco *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2017) estableciendo un nuevo techo para la colocación de las VSs en las proximidades de la membrana que harían posible la potenciación con isoproterenol y la potenciación de la liberación por los β ARs incluso con las estimulaciones moderadas de KCl, ya que, en este caso, no se agotaría el RRP. Habría que realizar estos experimentos de liberación de glutamato y de distribución de las VSs con microscopía electrónica y de electrofisiología (RRP, mEPSC, LTP) para poder hacer una interpretación correcta de las mejoras funcionales observadas tras la inhibición de la PDE2A.

6. Potenciación de la liberación de glutamato por el receptor mGlu7.

Los receptores mGlu7 ejercen un control dual sobre la liberación de neurotransmisor que se observa en sinaptosomas y en rodajas de hipocampo con experimentos de electrofisiología. La activación breve de estos receptores con el agonista L-AP4 reduce la liberación de glutamato por acción de una proteína G sensible a la toxina pertúsica y la inhibición de canales de Ca^{2+} (Millan *et al.*, 2003a; Martin *et al.*, 2010). Sin embargo, la activación prolongada del receptor inicia una señalización insensible a la toxina pertussis que resulta en la potenciación de la liberación. En este caso se activa la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza PIP_2 generando DAG e IP_3 . El DAG activa y trasloca proteínas

Munc13 y esto resulta en un incremento de las VSs colocadas en contacto con la membrana de la zona activa, que es el que sostiene el efecto potenciador de la liberación del neurotransmisor (Martin *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2018). Aunque la respuesta de potenciación se desarrolla más lentamente que la de inhibición cuando se usan agonistas exógenos, la estimulación endógena acelera la potenciación, que ahora ocluye y domina sobre la respuesta inhibitoria (Martin *et al.*, 2018), lo que sugiere la existencia de algún factor limitante en el primer caso.

En ausencia de FMRP la potenciación de la liberación se pierde independientemente del nivel al que se active la vía (con el agonista del receptor mGlu7 L-AP4, con el activador de la adenilato ciclasa forskolina, o con el activador de las proteínas Epac 8-pCPT) cuando se estimulan los sinaptosomas moderadamente con KCl 5 mM. Una posible explicación sería que el estímulo agota el RRP y el receptor no es capaz de promover más acercamiento de vesículas a la membrana. Sin embargo, las tres respuestas se rescatan con el estímulo débil de ionomicina, por lo que se puede concluir que no parece que haya cambios aparentes en la eficacia de la vía de señalización por mGlu7 en contraste con lo que ocurre con el β AR. Además, esto está de acuerdo con la ausencia de cambios en la expresión del receptor (Figura 53). Por otro lado, la respuesta de potenciación de L-AP4, pero no la de inhibición, se pierde en experimentos de transmisión sináptica de las sinapsis SC-CA1 del hipocampo (Martin *et al.*, 2019 resultados no publicados) lo que parece indicar que la ionomicina es capaz de modular la entrada de calcio a unos niveles suficientemente bajos como para no agotar el RRP, cosa que no ocurre con el estímulo empleado en electrofisiología.

Luego la potenciación mediada por los receptores mGlu7 comparte con la de los β ARs el que ambas respuestas se pierden cuando los sinaptosomas *Fmr1* KO se estimulan con KCl. Ahora bien, a diferencia de la potenciación por los β ARs, en el caso del receptor mGlu7 no parece existir ningún cambio en la eficacia de la vía de señalización.

7. La LTP de las fibras paralelas depende de los β ARs.

La pérdida de FMRP afecta a formas de plasticidad de origen postsináptico. La ausencia de FMRP conlleva un exceso de LTD dependiente de receptores mGlu1 que se asocia con espinas dendríticas alargadas e inmaduras en el hipocampo (Huber *et al.*, 2002) y en el cerebelo (Koekkoek *et al.*, 2005). En el hipocampo afecta al aprendizaje espacial (Huber *et al.*, 2002) y en el cerebelo, a la respuesta condicionada del párpado (Koekkoek *et al.*, 2005).

FMRP también participa en la plasticidad sináptica, que se expresa como un cambio sostenido en la liberación de neurotransmisor. Los datos obtenidos en esta Tesis muestran que las sinapsis corticales *Fmr1* KO pierden la potenciación de la liberación de glutamato por el agonista de los receptores β AR isoproterenol. Esta potenciación depende de la generación de AMPc y se rescata en los sinaptosomas *Fmr1* KO con inhibidores de la PDE2A. Es posible que esta pérdida de la potenciación afecte a formas de plasticidad presináptica que se expresan como un cambio sostenido en la liberación de neurotransmisor. La LTP en la corteza cingulada anterior se pierde en los ratones *Fmr1* KO (Koga *et al.*, 2015b). Esta forma de plasticidad implica a ACs dependientes de Ca^{2+} y de la activación de la vía AMPc/PKA (Koga *et al.*, 2015a). Se desconoce, sin embargo, si en la LTP de la corteza cingulada interviene la potenciación sináptica producida por los β ARs, a pesar del papel prominente que tiene esta LTP en aprendizaje, memoria y procesamiento emocional (Frankland *et al.*, 2004) y de que el ratón carente de FMRP tiene déficits de aprendizaje y ansiedad (Guo *et al.*, 2012). Por tanto, parece importante explorar si la LTP de la corteza cingulada requiere la contribución de los β ARs, si los inhibidores de la PDE2A rescatan esta LTP en la sinapsis *Fmr1* KO y si el rescate ayuda a restablecer las funciones cerebrales alteradas en el síndrome del X frágil.

La LTP de las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje se pierde en los animales *Fmr1* KO (Figura 46). Esta forma de plasticidad sináptica es inducida por la activación de la adenilato ciclasa dependiente de Ca^{2+} y la generación de AMPc (Salin *et al.*, 1996; Storm *et al.*, 1998) y se expresa

por medio de un incremento en la liberación de neurotransmisor dependiente de RIM1 α (Castillo *et al.*, 2002; Lonart *et al.*, 2003). En experimentos llevados a cabo en este laboratorio se ha encontrado que, en ratones WT, esta forma de plasticidad sináptica se pierde con el antagonista de los receptores adrenérgicos propranolol, por lo que parece que la PF-PC LTP requiere la activación de los β ARs. Es probable que el protocolo de estimulación utilizado para inducir la PF-PC LTP active terminales noradrenérgicos de la corteza cerebral que forman varicosidades cercanas y opuestas a las dendritas de las neuronas de Purkinje (Landis & Bloom, 1975) y que la noradrenalina liberada active heteroreceptores β adrenérgicos en los terminales sinápticos de las fibras paralelas. Por tanto, los β ARs pueden contribuir, junto con la entrada de Ca^{2+} , a estimular la adenilato ciclasa dependiente de Ca^{2+} que participa en la PF-PC LTP (Storm *et al.*, 1998). Esto es compatible con el hecho de que las ACs del grupo I sensibles a Ca^{2+} también posean un sitio de unión para proteínas Gs (Sadana & Dessauer, 2009).

La PF-PC LTP se asocia a un incremento en el tamaño del RRP. Sin embargo, en las sinapsis *Fmr1* KO esta respuesta está ocluida, ya que el tamaño del RRP está ya aumentado basalmente en magnitud similar a la de las sinapsis WT potenciadas tras inducir la PF-PC LTP (Figura 47). Los β ARs incrementan el tamaño del RRP (medido tanto por depleción de las VSs tras estimulación de alta frecuencia como por la distribución de las VSs con microscopía electrónica) y la liberación espontánea (medida tanto por la frecuencia de las mEPSCs en rodajas como por la liberación de glutamato en sinaptosomas). Esto está de acuerdo con la importancia del RRP como uno de los determinantes de la fuerza sináptica (Thanawala & Regehr, 2013) ya que representa aquellas VSs competentes para la fusión. Sin embargo, en las sinapsis *Fmr1* KO, el RRP y la liberación espontánea están aumentados basalmente, lo que ocluye una potenciación adicional por el agonista isoproterenol. Luego la incapacidad de las sinapsis *Fmr1* KO de movilizar más vesículas para la fusión parece ser la causa de la pérdida de la PF-PC LTP. De ahí que entender por qué hay más VSs amarradas a la membrana en las sinapsis *Fmr1* KO sea importante para poder revertir este proceso y rescatar las respuestas de potenciación por los β ARs.

La disminución de la $[Ca^{2+}]_e$ restablece los efectos potenciadores de los β ARs en el RRP y la liberación espontánea y, además, rescata la PF-PC LTP en las sinapsis *Fmr1* KO (Figuras 48, 49 y 50). Esta estrategia abre la posibilidad de rescate con agonistas de receptores acoplados a proteínas G que inhiban la entrada de Ca^{2+} en los botones sinápticos de las fibras paralelas como se ha indicado antes. La reducción del RRP y el rescate de las respuestas de los β ARs podrían estar mediados por una atenuación de la actividad de las proteínas Munc13 que no sólo dependen de la unión de DAG (Betz *et al.*, 2001), sino, también, de la unión de Ca^{2+} -calmodulina, CaM, (Dimova *et al.*, 2006; Dimova *et al.*, 2009) y de Ca^{2+} y fosfolípidos (Shin *et al.*, 2010). Por lo que la disminución de $[Ca^{2+}]_e$ reduce el tamaño del RRP suficientemente para compensar el efecto positivo del Ca^{2+} y DAG elevados que se ha descrito en las sinapsis *Fmr1* KO (Betz *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2011b; Thanawala & Regehr, 2013; Tabet *et al.*, 2016a).

Los pacientes con autismo también sufren de alteraciones motoras (Vanvuchelen *et al.*, 2007) y los ratones *Fmr1* KO muestran deficiencia en el aprendizaje motor (Vinueza Veloz *et al.*, 2012). Dado que las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje están implicadas en el aprendizaje motor (Schonewille *et al.*, 2010; Gutierrez-Castellanos *et al.*, 2017; Hirano, 2018), sería importante explorar: (i) Si los agonistas de los receptores acoplados a proteína G que reducen la entrada de Ca^{2+} rescatan la potenciación por isoproterenol. (ii) Si estos agonistas y los inhibidores de la PDE2A rescatan la PF-PC LTP. (iii) Si estos tratamientos mejoran los déficits en aprendizaje motor de los animales *Fmr1* KO. Hay algunos ejemplos de aprendizaje motor que dependen de la actividad de sinapsis cerebelares entre las fibras paralelas y las células de Purkinje como el condicionamiento de los párpados (Koekkoek *et al.*, 2005), el reflejo Vestíbulo-Ocular (Gutierrez-Castellanos *et al.*, 2017) y estudios con la escalera Erasmus y con el rotarod (Galliano *et al.*, 2013).

Puesto que se en este trabajo se ha encontrado que la sinapsis PF-PC está alterada en ausencia de FMRP, se llevará a cabo la evaluación de animales *Fmr1*

KO mediante pruebas de comportamiento en las que estén implicadas estas sinapsis, a fin de determinar si existen cambios en el aprendizaje motor o en la coordinación. Si los hubiera, se procederá a la búsqueda de una estrategia farmacológica eficaz que pueda ser aplicada a los ratones para rescatar la alteración de la función sináptica y, así, corregir las alteraciones del componente motor. Esta estrategia irá enfocada a disminuir la entrada de calcio al terminal sináptico mediante el uso de agonistas de GPCRs que inhiban los VDCCs. Otra alternativa sería mediante el empleo de inhibidores de fosfodiesterasas que incrementen los niveles de AMPc, aumentando así su eficacia para activar la vía de potenciación de la liberación del neurotransmisor.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES:

1. La inhibición de la liberación de glutamato mediada por el receptor CB1 no está alterada en las sinapsis corticales de ratones carentes de FMRP.

2. La potenciación de la liberación de glutamato por los receptores β adrenérgicos se pierde en los ratones *Fmr1* KO por incapacidad del receptor para movilizar vesículas sinápticas hacia la membrana de la zona activa presináptica.

3. Una estimulación más débil de los sinaptosomas revela que la ausencia de potenciación de la liberación por los receptores β adrenérgicos en las sinapsis *Fmr1* KO es consecuencia también de la baja eficacia del AMPc para activar la vía de señalización que induce la potenciación. Esta potenciación se recupera mediante el bloqueo de la degradación del AMPc con inhibidores de la PDE2A.

4. La LTP de las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje del cerebelo, requiere la activación de los receptores β adrenérgicos y se pierde en los ratones *Fmr1* KO. La disminución de la concentración de Ca^{2+} extracelular rescata esta LTP.

5. La ausencia de la proteína FMRP no afecta a la eficacia de la señalización de los receptores mGlu7, de ahí que la potenciación de la liberación por estos receptores se recupere con una estimulación débil de los sinaptosomas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA:

- (1994) Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium. *Cell*, **78**, 23-33.
- Abe, T., Sugihara, H., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N. & Nakanishi, S. (1992) Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J Biol Chem*, **267**, 13361-13368.
- Acuna, C., Liu, X. & Sudhof, T.C. (2016) How to Make an Active Zone: Unexpected Universal Functional Redundancy between RIMs and RIM-BPs. *Neuron*, **91**, 792-807.
- Aiba, A., Chen, C., Herrup, K., Rosenmund, C., Stevens, C.F. & Tonegawa, S. (1994) Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice. *Cell*, **79**, 365-375.
- Airas, J.M., Betz, H. & El Far, O. (2001) PKC phosphorylation of a conserved serine residue in the C-terminus of group III metabotropic glutamate receptors inhibits calmodulin binding. *FEBS Lett*, **494**, 60-63.
- Akins, M.R., Berk-Rauch, H.E. & Fallon, J.R. (2009) Presynaptic translation: stepping out of the postsynaptic shadow. *Front Neural Circuits*, **3**, 17.
- Alonso, B., Bartolome-Martin, D., Ferrero, J.J., Ramirez-Franco, J., Torres, M. & Sanchez-Prieto, J. (2017) CB1 receptors down-regulate a cAMP/Epac2/PLC pathway to silence the nerve terminals of cerebellar granule cells. *J Neurochem*, **142**, 350-364.
- Alpatov, R., Lesch, B.J., Nakamoto-Kinoshita, M., Blanco, A., Chen, S., Stutzer, A., Armache, K.J., Simon, M.D., Xu, C., Ali, M., Murn, J., Pristic, S., Kutateladze, T.G., Vakoc, C.R., Min, J., Kingston, R.E., Fischle, W., Warren, S.T., Page, D.C. & Shi, Y. (2014) A chromatin-dependent role of the fragile X mental retardation protein FMRP in the DNA damage response. *Cell*, **157**, 869-881.
- Andersen, B.B., Korbo, L. & Pakkenberg, B. (1992) A quantitative study of the human cerebellum with unbiased stereological techniques. *J Comp Neurol*, **326**, 549-560.

- Andrews-Zwilling, Y.S., Kawabe, H., Reim, K., Varoqueaux, F. & Brose, N. (2006) Binding to Rab3A-interacting molecule RIM regulates the presynaptic recruitment of Munc13-1 and ubMunc13-2. *J Biol Chem*, **281**, 19720-19731.
- Androschuk, A., He, R.X., Weber, S., Rosenfelt, C. & Bolduc, F.V. (2018) Stress Odorant Sensory Response Dysfunction in Drosophila Fragile X Syndrome Mutants. *Front Mol Neurosci*, **11**, 242.
- Antar, L.N., Afroz, R., Dichtenberg, J.B., Carroll, R.C. & Bassell, G.J. (2004) Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci*, **24**, 2648-2655.
- Antar, L.N., Li, C., Zhang, H., Carroll, R.C. & Bassell, G.J. (2006) Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity-dependent regulation of filopodia and spine synapses. *Mol Cell Neurosci*, **32**, 37-48.
- Aoki, C. & Pickel, V.M. (1992) C-terminal tail of beta-adrenergic receptors: immunocytochemical localization within astrocytes and their relation to catecholaminergic neurons in N. tractus solitarii and area postrema. *Brain Res*, **571**, 35-49.
- Aoki, C., Zemcik, B.A., Strader, C.D. & Pickel, V.M. (1989) Cytoplasmic loop of beta-adrenergic receptors: synaptic and intracellular localization and relation to catecholaminergic neurons in the nuclei of the solitary tracts. *Brain Res*, **493**, 331-347.
- Arnot, M.I., Stotz, S.C., Jarvis, S.E. & Zamponi, G.W. (2000) Differential modulation of N-type 1B and P/Q-type 1A calcium channels by different G protein subunit isoforms. *J Physiol*, **527 Pt 2**, 203-212.
- Ashton, J.C., Friberg, D., Darlington, C.L. & Smith, P.F. (2006) Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett*, **396**, 113-116.
- Ashton, J.C., Rahman, R.M., Nair, S.M., Sutherland, B.A., Glass, M. & Appleton, I. (2007) Cerebral hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion induce expression of the cannabinoid CB2 receptor in the brain. *Neurosci Lett*, **412**, 114-117.
- Augustin, I., Rosenmund, C., Sudhof, T.C. & Brose, N. (1999) Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature*, **400**, 457-461.

- Ayala, J.E., Niswender, C.M., Luo, Q., Banko, J.L. & Conn, P.J. (2008) Group III mGluR regulation of synaptic transmission at the SC-CA1 synapse is developmentally regulated. *Neuropharmacology*, **54**, 804-814.
- Baggelaar, M.P., Maccarrone, M. & van der Stelt, M. (2018) 2-Arachidonoylglycerol: A signaling lipid with manifold actions in the brain. *Prog Lipid Res*, **71**, 1-17.
- Bagher, A.M., Laprairie, R.B., Toguri, J.T., Kelly, M.E.M. & Denovan-Wright, E.M. (2017) Bidirectional allosteric interactions between cannabinoid receptor 1 (CB1) and dopamine receptor 2 long (D2L) heterotetramers. *Eur J Pharmacol*, **813**, 66-83.
- Bailey, D.B., Jr., Berry-Kravis, E., Wheeler, A., Raspa, M., Merrien, F., Ricart, J., Koumaras, B., Rosenkranz, G., Tomlinson, M., von Raison, F. & Apostol, G. (2016) Mavoglurant in adolescents with fragile X syndrome: analysis of Clinical Global Impression-Improvement source data from a double-blind therapeutic study followed by an open-label, long-term extension study. *J Neurodev Disord*, **8**, 1.
- Baskys, A. & Malenka, R.C. (1991) Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J Physiol*, **444**, 687-701.
- Bean, B.P. (1989) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature*, **340**, 153-156.
- Bear, M.F., Huber, K.M. & Warren, S.T. (2004) The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci*, **27**, 370-377.
- Beard, M.B., Olsen, A.E., Jones, R.E., Erdogan, S., Houslay, M.D. & Bolger, G.B. (2000) UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions. *J Biol Chem*, **275**, 10349-10358.
- Beautrait, A., Paradis, J.S., Zimmerman, B., Giubilaro, J., Nikolajev, L., Armando, S., Kobayashi, H., Yamani, L., Namkung, Y., Heydenreich, F.M., Khoury, E., Audet, M., Roux, P.P., Veprintsev, D.B., Laporte, S.A. & Bouvier, M. (2017) A new inhibitor of the beta-arrestin/AP2 endocytic complex reveals interplay between GPCR internalization and signalling. *Nat Commun*, **8**, 15054.
- Becker, J.A., Clesse, D., Spiegelhalter, C., Schwab, Y., Le Merrer, J. & Kieffer, B.L. (2014) Autistic-like syndrome in mu opioid receptor null mice is relieved by facilitated mGluR4 activity. *Neuropsychopharmacology*, **39**, 2049-2060.

- Bechara, E.G., Didiot, M.C., Melko, M., Davidovic, L., Bensaid, M., Martin, P., Castets, M., Pognonec, P., Khandjian, E.W., Moine, H. & Bardoni, B. (2009) A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS Biol*, **7**, e16.
- Beguín, P., Nagashima, K., Nishimura, M., Gonoï, T. & Seino, S. (1999) PKA-mediated phosphorylation of the human K(ATP) channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J*, **18**, 4722-4732.
- Bernardet, M. & Crusio, W.E. (2006) Fmr1 KO mice as a possible model of autistic features. *ScientificWorldJournal*, **6**, 1164-1176.
- Berry-Kravis, E. & Ciurlionis, R. (1998) Overexpression of fragile X gene (FMR-1) transcripts increases cAMP production in neural cells. *J Neurosci Res*, **51**, 41-48.
- Berry-Kravis, E., Des Portes, V., Hagerman, R., Jacquemont, S., Charles, P., Visootsak, J., Brinkman, M., Rerat, K., Koumaras, B., Zhu, L., Barth, G.M., Jaecklin, T., Apostol, G. & von Raison, F. (2016) Mavoglurant in fragile X syndrome: Results of two randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Sci Transl Med*, **8**, 321ra325.
- Berry-Kravis, E., Hicar, M. & Ciurlionis, R. (1995) Reduced cyclic AMP production in fragile X syndrome: cytogenetic and molecular correlations. *Pediatr Res*, **38**, 638-643.
- Berry-Kravis, E. & Huttenlocher, P.R. (1992) Cyclic AMP metabolism in fragile X syndrome. *Ann Neurol*, **31**, 22-26.
- Berry-Kravis, E. & Sklena, P. (1993) Demonstration of abnormal cyclic AMP production in platelets from patients with fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, **45**, 81-87.
- Bertaso, F., Lill, Y., Airas, J.M., Espeut, J., Blahos, J., Bockaert, J., Fagni, L., Betz, H. & El-Far, O. (2006) MacMARCKS interacts with the metabotropic glutamate receptor type 7 and modulates G protein-mediated constitutive inhibition of calcium channels. *J Neurochem*, **99**, 288-298.
- Betz, A., Ashery, U., Rickmann, M., Augustin, I., Neher, E., Sudhof, T.C., Rettig, J. & Brose, N. (1998) Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron*, **21**, 123-136.

- Betz, A., Thakur, P., Junge, H.J., Ashery, U., Rhee, J.S., Scheuss, V., Rosenmund, C., Rettig, J. & Brose, N. (2001) Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *Neuron*, **30**, 183-196.
- Bhakar, A.L., Dolen, G. & Bear, M.F. (2012) The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annu Rev Neurosci*, **35**, 417-443.
- Bhattacharya, A., Kaphzan, H., Alvarez-Dieppa, A.C., Murphy, J.P., Pierre, P. & Klann, E. (2012) Genetic removal of p70 S6 kinase 1 corrects molecular, synaptic, and behavioral phenotypes in fragile X syndrome mice. *Neuron*, **76**, 325-337.
- Billups, B., Graham, B.P., Wong, A.Y. & Forsythe, I.D. (2005) Unmasking group III metabotropic glutamate autoreceptor function at excitatory synapses in the rat CNS. *J Physiol*, **565**, 885-896.
- Borland, G., Gupta, M., Magiera, M.M., Rundell, C.J., Fuld, S. & Yarwood, S.J. (2006) Microtubule-associated protein 1B-light chain 1 enhances activation of Rap1 by exchange protein activated by cyclic AMP but not intracellular targeting. *Mol Pharmacol*, **69**, 374-384.
- Boudin, H., Doan, A., Xia, J., Shigemoto, R., Huganir, R.L., Worley, P. & Craig, A.M. (2000) Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. *Neuron*, **28**, 485-497.
- Boyken, J., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Jahn, R. & Chua, J.J. (2013) Molecular profiling of synaptic vesicle docking sites reveals novel proteins but few differences between glutamatergic and GABAergic synapses. *Neuron*, **78**, 285-297.
- Branham, M.T., Mayorga, L.S. & Tomes, C.N. (2006) Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *J Biol Chem*, **281**, 8656-8666.
- Brenowitz, S.D. & Regehr, W.G. (2005) Associative short-term synaptic plasticity mediated by endocannabinoids. *Neuron*, **45**, 419-431.
- Brodin, L. & Shupliakov, O. (2006) Giant reticulospinal synapse in lamprey: molecular links between active and periaxial zones. *Cell Tissue Res*, **326**, 301-310.
- Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y. & Sudhof, T.C. (1995) Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *J Biol Chem*, **270**, 25273-25280.

- Brose, N., Petrenko, A.G., Sudhof, T.C. & Jahn, R. (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, **256**, 1021-1025.
- Brose, N. & Rosenmund, C. (2002) Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci*, **115**, 4399-4411.
- Brown, S.P., Safo, P.K. & Regehr, W.G. (2004) Endocannabinoids inhibit transmission at granule cell to Purkinje cell synapses by modulating three types of presynaptic calcium channels. *J Neurosci*, **24**, 5623-5631.
- Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J.C., O'Donnell, W.T., Tenenbaum, S.A., Jin, X., Feng, Y., Wilkinson, K.D., Keene, J.D., Darnell, R.B. & Warren, S.T. (2001) Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*, **107**, 477-487.
- Bureau, I., Shepherd, G.M. & Svoboda, K. (2008) Circuit and plasticity defects in the developing somatosensory cortex of FMR1 knock-out mice. *J Neurosci*, **28**, 5178-5188.
- Burre, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R. & Sudhof, T.C. (2010) Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*, **329**, 1663-1667.
- Busch, L., Sterin-Borda, L. & Borda, E. (2004) Expression and biological effects of CB1 cannabinoid receptor in rat parotid gland. *Biochem Pharmacol*, **68**, 1767-1774.
- Bushell, T.J., Sansig, G., Collett, V.J., van der Putten, H. & Collingridge, G.L. (2002) Altered short-term synaptic plasticity in mice lacking the metabotropic glutamate receptor mGlu7. *ScientificWorldJournal*, **2**, 730-737.
- Busquets-Garcia, A., Gomis-Gonzalez, M., Guegan, T., Agustin-Pavon, C., Pastor, A., Mato, S., Perez-Samartin, A., Matute, C., de la Torre, R., Dierssen, M., Maldonado, R. & Ozaita, A. (2013) Targeting the endocannabinoid system in the treatment of fragile X syndrome. *Nat Med*, **19**, 603-607.
- Busquets Garcia, A., Soria-Gomez, E., Bellocchio, L. & Marsicano, G. (2016) Cannabinoid receptor type-1: breaking the dogmas. *F1000Res*, **5**.
- Capogna, M. (2004) Distinct properties of presynaptic group II and III metabotropic glutamate receptor-mediated inhibition of perforant pathway-CA1 EPSCs. *Eur J Neurosci*, **19**, 2847-2858.

- Castagnola, S., Delhay, S., Folci, A., Paquet, A., Brau, F., Duprat, F., Jarjat, M., Grossi, M., Beal, M., Martin, S., Mantegazza, M., Bardoni, B. & Maurin, T. (2018) New Insights Into the Role of Cav2 Protein Family in Calcium Flux Deregulation in Fmr1-KO Neurons. *Front Mol Neurosci*, **11**, 342.
- Castillo, P.E. (2012) Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **4**.
- Castillo, P.E., Schoch, S., Schmitz, F., Sudhof, T.C. & Malenka, R.C. (2002) RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature*, **415**, 327-330.
- Colmers, P.L.W. & Bains, J.S. (2018) Presynaptic mGluRs Control the Duration of Endocannabinoid-Mediated DSI. *J Neurosci*, **38**, 10444-10453.
- Coppola, T., Magnin-Luthi, S., Perret-Menoud, V., Gattesco, S., Schiavo, G. & Regazzi, R. (2001) Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca²⁺ channels, SNAP-25, and synaptotagmin. *J Biol Chem*, **276**, 32756-32762.
- Chanda, D., Neumann, D. & Glatz, J.F.C. (2019) The endocannabinoid system: Overview of an emerging multi-faceted therapeutic target. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **140**, 51-56.
- Chandra, S., Gallardo, G., Fernandez-Chacon, R., Schluter, O.M. & Sudhof, T.C. (2005) Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*, **123**, 383-396.
- Chavis, P., Mollard, P., Bockaert, J. & Manzoni, O. (1998) Visualization of cyclic AMP-regulated presynaptic activity at cerebellar granule cells. *Neuron*, **20**, 773-781.
- Chen, D.J., Gao, M., Gao, F.F., Su, Q.X. & Wu, J. (2017) Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. *Acta Pharmacol Sin*, **38**, 312-316.
- Chen, L. & Toth, M. (2001) Fragile X mice develop sensory hyperreactivity to auditory stimuli. *Neuroscience*, **103**, 1043-1050.
- Chen, L., Yun, S.W., Seto, J., Liu, W. & Toth, M. (2003) The fragile X mental retardation protein binds and regulates a novel class of mRNAs containing U rich target sequences. *Neuroscience*, **120**, 1005-1017.
- Chen, Y.A., Scales, S.J., Patel, S.M., Doung, Y.C. & Scheller, R.H. (1999) SNARE complex formation is triggered by Ca²⁺ and drives membrane fusion. *Cell*, **97**, 165-174.

- Chen, Z., Cooper, B., Kalla, S., Varoqueaux, F. & Young, S.M., Jr. (2013) The Munc13 proteins differentially regulate readily releasable pool dynamics and calcium-dependent recovery at a central synapse. *J Neurosci*, **33**, 8336-8351.
- Cheng, G.R., Li, X.Y., Xiang, Y.D., Liu, D., McClintock, S.M. & Zeng, Y. (2017) The implication of AMPA receptor in synaptic plasticity impairment and intellectual disability in fragile X syndrome. *Physiol Res*, **66**, 715-727.
- Cheng, Q., Song, S.H. & Augustine, G.J. (2018) Molecular Mechanisms of Short-Term Plasticity: Role of Synapsin Phosphorylation in Augmentation and Potentiation of Spontaneous Glutamate Release. *Front Synaptic Neurosci*, **10**, 33.
- Chevalleyre, V. & Castillo, P.E. (2003) Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron*, **38**, 461-472.
- Chevalleyre, V., Heifets, B.D., Kaeser, P.S., Sudhof, T.C. & Castillo, P.E. (2007) Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha. *Neuron*, **54**, 801-812.
- Chevalleyre, V., Takahashi, K.A. & Castillo, P.E. (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*, **29**, 37-76.
- Chheda, M.G., Ashery, U., Thakur, P., Rettig, J. & Sheng, Z.H. (2001) Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nat Cell Biol*, **3**, 331-338.
- Childers, S.R. & Deadwyler, S.A. (1996) Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, **52**, 819-827.
- Chmielewska, J.J., Kuzniewska, B., Milek, J., Urbanska, K. & Dziembowska, M. (2019) Neuroligin 1, 2, and 3 Regulation at the Synapse: FMRP-Dependent Translation and Activity-Induced Proteolytic Cleavage. *Mol Neurobiol*, **56**, 2741-2759.
- Cho, R.W., Buhl, L.K., Volfson, D., Tran, A., Li, F., Akbergenova, Y. & Littleton, J.T. (2015) Phosphorylation of Complexin by PKA Regulates Activity-Dependent Spontaneous Neurotransmitter Release and Structural Synaptic Plasticity. *Neuron*, **88**, 749-761.
- Choi, C.H., McBride, S.M., Schoenfeld, B.P., Liebelt, D.A., Ferreira, D., Ferrick, N.J., Hinchey, P., Kollaros, M., Rudominer, R.L., Terlizzi, A.M., Koenigsberg, E., Wang, Y., Sumida, A., Nguyen, H.T., Bell, A.J., McDonald, T.V. & Jongens, T.A.

- (2010) Age-dependent cognitive impairment in a *Drosophila* fragile X model and its pharmacological rescue. *Biogerontology*, **11**, 347-362.
- Choi, C.H., Schoenfeld, B.P., Bell, A.J., Hinchey, J., Rosenfelt, C., Gertner, M.J., Campbell, S.R., Emerson, D., Hinchey, P., Kollaros, M., Ferrick, N.J., Chambers, D.B., Langer, S., Sust, S., Malik, A., Terlizzi, A.M., Liebelt, D.A., Ferreira, D., Sharma, A., Koenigsberg, E., Choi, R.J., Louneva, N., Arnold, S.E., Featherstone, R.E., Siegel, S.J., Zukin, R.S., McDonald, T.V., Bolduc, F.V., Jongens, T.A. & McBride, S.M. (2016) Multiple Drug Treatments That Increase cAMP Signaling Restore Long-Term Memory and Aberrant Signaling in Fragile X Syndrome Models. *Front Behav Neurosci*, **10**, 136.
- Choi, C.H., Schoenfeld, B.P., Bell, A.J., Hinchey, P., Kollaros, M., Gertner, M.J., Woo, N.H., Tranfaglia, M.R., Bear, M.F., Zukin, R.S., McDonald, T.V., Jongens, T.A. & McBride, S.M. (2011) Pharmacological reversal of synaptic plasticity deficits in the mouse model of fragile X syndrome by group II mGluR antagonist or lithium treatment. *Brain Res*, **1380**, 106-119.
- Choi, C.H., Schoenfeld, B.P., Weisz, E.D., Bell, A.J., Chambers, D.B., Hinchey, J., Choi, R.J., Hinchey, P., Kollaros, M., Gertner, M.J., Ferrick, N.J., Terlizzi, A.M., Yohn, N., Koenigsberg, E., Liebelt, D.A., Zukin, R.S., Woo, N.H., Tranfaglia, M.R., Louneva, N., Arnold, S.E., Siegel, S.J., Bolduc, F.V., McDonald, T.V., Jongens, T.A. & McBride, S.M. (2015) PDE-4 inhibition rescues aberrant synaptic plasticity in *Drosophila* and mouse models of fragile X syndrome. *J Neurosci*, **35**, 396-408.
- Christie, S.B., Akins, M.R., Schwob, J.E. & Fallon, J.R. (2009) The FXG: a presynaptic fragile X granule expressed in a subset of developing brain circuits. *J Neurosci*, **29**, 1514-1524.
- Daaka, Y., Luttrell, L.M. & Lefkowitz, R.J. (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, **390**, 88-91.
- Darnell, J.C., Fraser, C.E., Mostovetsky, O., Stefani, G., Jones, T.A., Eddy, S.R. & Darnell, R.B. (2005) Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes Dev*, **19**, 903-918.
- Darnell, J.C., Jensen, K.B., Jin, P., Brown, V., Warren, S.T. & Darnell, R.B. (2001) Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell*, **107**, 489-499.
- Darnell, J.C., Van Driesche, S.J., Zhang, C., Hung, K.Y., Mele, A., Fraser, C.E., Stone, E.F., Chen, C., Fak, J.J., Chi, S.W., Licatalosi, D.D., Richter, J.D. & Darnell, R.B.

- (2011) FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, **146**, 247-261.
- Das, J., Kedei, N., Kelsey, J.S., You, Y., Pany, S., Mitchell, G.A., Lewin, N.E. & Blumberg, P.M. (2018) Critical Role of Trp-588 of Presynaptic Munc13-1 for Ligand Binding and Membrane Translocation. *Biochemistry*, **57**, 732-741.
- Davis, J.K. & Broadie, K. (2017) Multifarious Functions of the Fragile X Mental Retardation Protein. *Trends Genet*, **33**, 703-714.
- de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. (2000) Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem*, **275**, 20829-20836.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, **396**, 474-477.
- Deak, F., Xu, Y., Chang, W.P., Dulubova, I., Khvotchev, M., Liu, X., Sudhof, T.C. & Rizo, J. (2009) Munc18-1 binding to the neuronal SNARE complex controls synaptic vesicle priming. *J Cell Biol*, **184**, 751-764.
- Deng, L., Kaeser, P.S., Xu, W. & Sudhof, T.C. (2011a) RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13. *Neuron*, **69**, 317-331.
- Deng, P.Y. & Klyachko, V.A. (2016) Genetic upregulation of BK channel activity normalizes multiple synaptic and circuit defects in a mouse model of fragile X syndrome. *J Physiol*, **594**, 83-97.
- Deng, P.Y., Rotman, Z., Blundon, J.A., Cho, Y., Cui, J., Cavalli, V., Zakharenko, S.S. & Klyachko, V.A. (2013) FMRP regulates neurotransmitter release and synaptic information transmission by modulating action potential duration via BK channels. *Neuron*, **77**, 696-711.
- Deng, P.Y., Sojka, D. & Klyachko, V.A. (2011b) Abnormal presynaptic short-term plasticity and information processing in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*, **31**, 10971-10982.
- Dictenberg, J.B., Swanger, S.A., Antar, L.N., Singer, R.H. & Bassell, G.J. (2008) A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev Cell*, **14**, 926-939.

- Dimova, K., Kalkhof, S., Pottratz, I., Ihling, C., Rodriguez-Castaneda, F., Liepold, T., Griesinger, C., Brose, N., Sinz, A. & Jahn, O. (2009) Structural insights into the calmodulin-Munc13 interaction obtained by cross-linking and mass spectrometry. *Biochemistry*, **48**, 5908-5921.
- Dimova, K., Kawabe, H., Betz, A., Brose, N. & Jahn, O. (2006) Characterization of the Munc13-calmodulin interaction by photoaffinity labeling. *Biochim Biophys Acta*, **1763**, 1256-1265.
- Ding, Q., Sethna, F. & Wang, H. (2014) Behavioral analysis of male and female Fmr1 knockout mice on C57BL/6 background. *Behav Brain Res*, **271**, 72-78.
- Dolen, G. & Bear, M.F. (2008) Role for metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in the pathogenesis of fragile X syndrome. *J Physiol*, **586**, 1503-1508.
- Dolen, G., Osterweil, E., Rao, B.S., Smith, G.B., Auerbach, B.D., Chattarji, S. & Bear, M.F. (2007) Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron*, **56**, 955-962.
- Dulubova, I., Khvotchev, M., Liu, S., Huryeva, I., Sudhof, T.C. & Rizo, J. (2007) Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 2697-2702.
- Dulubova, I., Lou, X., Lu, J., Huryeva, I., Alam, A., Schneggenburger, R., Sudhof, T.C. & Rizo, J. (2005) A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J*, **24**, 2839-2850.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T.C. & Rizo, J. (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J*, **18**, 4372-4382.
- Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., Heath, J.W., Kidd, G.J. & Rostas, J.A. (1986) A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Res*, **372**, 115-129.
- Dzhura, I., Chepurny, O.G., Leech, C.A., Roe, M.W., Dzhura, E., Xu, X., Lu, Y., Schwede, F., Genieser, H.G., Smrcka, A.V. & Holz, G.G. (2011) Phospholipase C-epsilon links Epac2 activation to the potentiation of glucose-stimulated insulin secretion from mouse islets of Langerhans. *Islets*, **3**, 121-128.
- El Far, O. & Betz, H. (2002) G-protein-coupled receptors for neurotransmitter amino acids: C-terminal tails, crowded signalosomes. *Biochem J*, **365**, 329-336.
- El Moustaine, D., Granier, S., Doumazane, E., Scholler, P., Rahmeh, R., Bron, P., Mouillac, B., Baneres, J.L., Rondard, P. & Pin, J.P. (2012) Distinct roles of

- metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 16342-16347.
- Enserink, J.M., Christensen, A.E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H.G., Doskeland, S.O., Blank, J.L. & Bos, J.L. (2002) A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol*, **4**, 901-906.
- Ermolyuk, Y.S., Alder, F.G., Surges, R., Pavlov, I.Y., Timofeeva, Y., Kullmann, D.M. & Volynski, K.E. (2013) Differential triggering of spontaneous glutamate release by P/Q-, N- and R-type Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci*, **16**, 1754-1763.
- Evans, D.I., Jones, R.S. & Woodhall, G. (2000) Activation of presynaptic group III metabotropic receptors enhances glutamate release in rat entorhinal cortex. *J Neurophysiol*, **83**, 2519-2525.
- Evans, G.J. & Morgan, A. (2002) Phosphorylation-dependent interaction of the synaptic vesicle proteins cysteine string protein and synaptotagmin I. *Biochem J*, **364**, 343-347.
- Ezzili, C., Otrubova, K. & Boger, D.L. (2010) Fatty acid amide signaling molecules. *Bioorg Med Chem Lett*, **20**, 5959-5968.
- Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T. & Jahn, R. (1998) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15781-15786.
- Fernandes, H.B., Riordan, S., Nomura, T., Remmers, C.L., Kraniotis, S., Marshall, J.J., Kukreja, L., Vassar, R. & Contractor, A. (2015) Epac2 Mediates cAMP-Dependent Potentiation of Neurotransmission in the Hippocampus. *J Neurosci*, **35**, 6544-6553.
- Fernandez, E., Rajan, N. & Bagni, C. (2013) The FMRP regulon: from targets to disease convergence. *Front Neurosci*, **7**, 191.
- Ferrero, J.J., Alvarez, A.M., Ramirez-Franco, J., Godino, M.C., Bartolome-Martin, D., Aguado, C., Torres, M., Lujan, R., Ciruela, F. & Sanchez-Prieto, J. (2013a) beta-Adrenergic receptors activate exchange protein directly activated by cAMP (Epac), translocate Munc13-1, and enhance the Rab3A-RIM1alpha interaction to potentiate glutamate release at cerebrocortical nerve terminals. *J Biol Chem*, **288**, 31370-31385.

- Ferrero, J.J., Bartolome-Martin, D., Torres, M. & Sanchez-Prieto, J. (2013b) Potentiation of mGlu7 receptor-mediated glutamate release at nerve terminals containing N and P/Q type Ca²⁺ channels. *Neuropharmacology*, **67**, 213-222.
- Ferrero, J.J., Torres, M. & Sanchez-Prieto, J. (2011) Inhibitors of diacylglycerol metabolism reduce time to the onset of glutamate release potentiation by mGlu7 receptors. *Neurosci Lett*, **500**, 144-147.
- Ferron, L., Nieto-Rostro, M., Cassidy, J.S. & Dolphin, A.C. (2014) Fragile X mental retardation protein controls synaptic vesicle exocytosis by modulating N-type calcium channel density. *Nat Commun*, **5**, 3628.
- Fertig, B.A. & Baillie, G.S. (2018) PDE4-Mediated cAMP Signalling. *J Cardiovasc Dev Dis*, **5**.
- Fisher, N.M., Seto, M., Lindsley, C.W. & Niswender, C.M. (2018) Metabotropic Glutamate Receptor 7: A New Therapeutic Target in Neurodevelopmental Disorders. *Front Mol Neurosci*, **11**, 387.
- Fitzjohn, S.M., Irving, A.J., Palmer, M.J., Harvey, J., Lodge, D. & Collingridge, G.L. (1996) Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett*, **203**, 211-213.
- Flor, P.J. & Acher, F.C. (2012) Orthosteric versus allosteric GPCR activation: the great challenge of group-III mGluRs. *Biochem Pharmacol*, **84**, 414-424.
- Fox, J.A. (1995) Irreversible and reversible blockade of IMR32 calcium channel currents by synthetic MVIIA and iodinated MVIIC omega-conopeptides. *Pflugers Arch*, **429**, 873-875.
- Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L. & Silva, A.J. (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*, **304**, 881-883.
- Fu, Q. & Xiang, Y.K. (2015) Trafficking of beta-Adrenergic Receptors: Implications in Intracellular Receptor Signaling. *Prog Mol Biol Transl Sci*, **132**, 151-188.
- Galliano, E., Gao, Z., Schonewille, M., Todorov, B., Simons, E., Pop, A.S., D'Angelo, E., van den Maagdenberg, A.M., Hoebeek, F.E. & De Zeeuw, C.I. (2013) Silencing the majority of cerebellar granule cells uncovers their essential role in motor learning and consolidation. *Cell Rep*, **3**, 1239-1251.

- Gee, C.E., Peterlik, D., Neuhauser, C., Bouhelal, R., Kaupmann, K., Laue, G., Uschold-Schmidt, N., Feuerbach, D., Zimmermann, K., Ofner, S., Cryan, J.F., van der Putten, H., Fendt, M., Vranesic, I., Glatthar, R. & Flor, P.J. (2014) Blocking metabotropic glutamate receptor subtype 7 (mGlu7) via the Venus flytrap domain (VFTD) inhibits amygdala plasticity, stress, and anxiety-related behavior. *J Biol Chem*, **289**, 10975-10987.
- Gekel, I. & Neher, E. (2008) Application of an Epac activator enhances neurotransmitter release at excitatory central synapses. *J Neurosci*, **28**, 7991-8002.
- Gelinas, J.N., Banko, J.L., Hou, L., Sonenberg, N., Weeber, E.J., Klann, E. & Nguyen, P.V. (2007) ERK and mTOR signaling couple beta-adrenergic receptors to translation initiation machinery to gate induction of protein synthesis-dependent long-term potentiation. *J Biol Chem*, **282**, 27527-27535.
- Gelinas, J.N., Banko, J.L., Peters, M.M., Klann, E., Weeber, E.J. & Nguyen, P.V. (2008a) Activation of exchange protein activated by cyclic-AMP enhances long-lasting synaptic potentiation in the hippocampus. *Learn Mem*, **15**, 403-411.
- Gelinas, J.N. & Nguyen, P.V. (2005) Beta-adrenergic receptor activation facilitates induction of a protein synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci*, **25**, 3294-3303.
- Gelinas, J.N., Tenorio, G., Lemon, N., Abel, T. & Nguyen, P.V. (2008b) Beta-adrenergic receptor activation during distinct patterns of stimulation critically modulates the PKA-dependence of LTP in the mouse hippocampus. *Learn Mem*, **15**, 281-289.
- Gerber, S.H., Rah, J.C., Min, S.W., Liu, X., de Wit, H., Dulubova, I., Meyer, A.C., Rizo, J., Arancillo, M., Hammer, R.E., Verhage, M., Rosenmund, C. & Sudhof, T.C. (2008) Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science*, **321**, 1507-1510.
- Gerdeman, G.L., Ronesi, J. & Lovinger, D.M. (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci*, **5**, 446-451.
- Gereau, R.W.t. & Conn, P.J. (1994) Presynaptic enhancement of excitatory synaptic transmission by beta-adrenergic receptor activation. *J Neurophysiol*, **72**, 1438-1442.
- Gibson, J.R., Bartley, A.F., Hays, S.A. & Huber, K.M. (2008) Imbalance of neocortical excitation and inhibition and altered UP states reflect network hyperexcitability in the mouse model of fragile X syndrome. *J Neurophysiol*, **100**, 2615-2626.

- Glass, M. & Felder, C.C. (1997) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci*, **17**, 5327-5333.
- Godino, M.C., Torres, M. & Sanchez-Prieto, J. (2005) Inhibition of N- and P/Q-type Ca²⁺ channels by cannabinoid receptors in single cerebrocortical nerve terminals. *FEBS Lett*, **579**, 768-772.
- Gomis-Gonzalez, M., Busquets-Garcia, A., Matute, C., Maldonado, R., Mato, S. & Ozaita, A. (2016) Possible Therapeutic Doses of Cannabinoid Type 1 Receptor Antagonist Reverses Key Alterations in Fragile X Syndrome Mouse Model. *Genes (Basel)*, **7**.
- Gorzakiewicz, A. & Szemraj, J. (2018) Brain endocannabinoid signaling exhibits remarkable complexity. *Brain Res Bull*, **142**, 33-46.
- Greenblatt, E.J. & Spradling, A.C. (2018) Fragile X mental retardation 1 gene enhances the translation of large autism-related proteins. *Science*, **361**, 709-712.
- Grossman, A.W., Aldridge, G.M., Weiler, I.J. & Greenough, W.T. (2006) Local protein synthesis and spine morphogenesis: Fragile X syndrome and beyond. *J Neurosci*, **26**, 7151-7155.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450.
- Guan, R., Dai, H., Tomchick, D.R., Dulubova, I., Machius, M., Sudhof, T.C. & Rizo, J. (2007) Crystal structure of the RIM1alpha C2B domain at 1.7 Å resolution. *Biochemistry*, **46**, 8988-8998.
- Guo, J. & Ikeda, S.R. (2004) Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol Pharmacol*, **65**, 665-674.
- Guo, W., Murthy, A.C., Zhang, L., Johnson, E.B., Schaller, E.G., Allan, A.M. & Zhao, X. (2012) Inhibition of GSK3 β improves hippocampus-dependent learning and rescues neurogenesis in a mouse model of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, **21**, 681-691.
- Gutierrez-Castellanos, N., Da Silva-Matos, C.M., Zhou, K., Canto, C.B., Renner, M.C., Koene, L.M.C., Ozyildirim, O., Sprengel, R., Kessels, H.W. & De Zeeuw, C.I.

- (2017) Motor Learning Requires Purkinje Cell Synaptic Potentiation through Activation of AMPA-Receptor Subunit GluA3. *Neuron*, **93**, 409-424.
- Hall, D.A. & Berry-Kravis, E. (2018) Fragile X syndrome and fragile X-associated tremor ataxia syndrome. *Handb Clin Neurol*, **147**, 377-391.
- Hanson, J.E. & Madison, D.V. (2007) Presynaptic FMR1 genotype influences the degree of synaptic connectivity in a mosaic mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*, **27**, 4014-4018.
- Hanson, P.I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R. & Heuser, J.E. (1997) Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell*, **90**, 523-535.
- Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Ogata, H., Emoto, K., Maejima, T., Araishi, K., Shin, H.S. & Kano, M. (2005) Phospholipase C β serves as a coincidence detector through its Ca²⁺ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron*, **45**, 257-268.
- Hayashi, M.K. (2018) Structure-Function Relationship of Transporters in the Glutamate-Glutamine Cycle of the Central Nervous System. *Int J Mol Sci*, **19**.
- He, C., Chen, F., Li, B. & Hu, Z. (2014) Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Prog Neurobiol*, **112**, 1-23.
- He, C.X. & Portera-Cailliau, C. (2013) The trouble with spines in fragile X syndrome: density, maturity and plasticity. *Neuroscience*, **251**, 120-128.
- Heckman, P.R., Blokland, A., Ramaekers, J. & Prickaerts, J. (2015) PDE and cognitive processing: beyond the memory domain. *Neurobiol Learn Mem*, **119**, 108-122.
- Heifets, B.D. & Castillo, P.E. (2009) Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, **71**, 283-306.
- Heifets, B.D., Chevalleyre, V. & Castillo, P.E. (2008) Interneuron activity controls endocannabinoid-mediated presynaptic plasticity through calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 10250-10255.
- Hell, J.W., Yokoyama, C.T., Breeze, L.J., Chavkin, C. & Catterall, W.A. (1995) Phosphorylation of presynaptic and postsynaptic calcium channels by cAMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons. *EMBO J*, **14**, 3036-3044.

- Herlitze, S., Garcia, D.E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1996) Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, **380**, 258-262.
- Hermans, E. & Challiss, R.A. (2001) Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochem J*, **359**, 465-484.
- Herrero, I. & Sanchez-Prieto, J. (1996) cAMP-dependent facilitation of glutamate release by beta-adrenergic receptors in cerebrocortical nerve terminals. *J Biol Chem*, **271**, 30554-30560.
- Hirano, T. (2018) Regulation and Interaction of Multiple Types of Synaptic Plasticity in a Purkinje Neuron and Their Contribution to Motor Learning. *Cerebellum*.
- Ho, B.Y., Uezono, Y., Takada, S., Takase, I. & Izumi, F. (1999) Coupling of the expressed cannabinoid CB1 and CB2 receptors to phospholipase C and G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels. *Receptors Channels*, **6**, 363-374.
- Hojo, M., Sudo, Y., Ando, Y., Minami, K., Takada, M., Matsubara, T., Kanaide, M., Taniyama, K., Sumikawa, K. & Uezono, Y. (2008) mu-Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *J Pharmacol Sci*, **108**, 308-319.
- Holz, G.G. (2004) Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes*, **53**, 5-13.
- Hou, L., Antion, M.D., Hu, D., Spencer, C.M., Paylor, R. & Klann, E. (2006) Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron*, **51**, 441-454.
- Houamed, K.M., Kuijper, J.L., Gilbert, T.L., Haldeman, B.A., O'Hara, P.J., Mulvihill, E.R., Almers, W. & Hagen, F.S. (1991) Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science*, **252**, 1318-1321.
- Howlett, A.C., Qualy, J.M. & Khachatrian, L.L. (1986) Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol*, **29**, 307-313.

- Hoxha, E., Tempia, F., Lippiello, P. & Miniaci, M.C. (2016) Modulation, Plasticity and Pathophysiology of the Parallel Fiber-Purkinje Cell Synapse. *Front Synaptic Neurosci*, **8**, 35.
- Huang, C.C. & Hsu, K.S. (2006) Presynaptic mechanism underlying cAMP-induced synaptic potentiation in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *Mol Pharmacol*, **69**, 846-856.
- Huang, C.C., Wang, S.J. & Gean, P.W. (1998) Selective enhancement of P-type calcium currents by isoproterenol in the rat amygdala. *J Neurosci*, **18**, 2276-2282.
- Huang, Y.Y. & Kandel, E.R. (1996) Modulation of both the early and the late phase of mossy fiber LTP by the activation of beta-adrenergic receptors. *Neuron*, **16**, 611-617.
- Huang, Y.Y., Zakharenko, S.S., Schoch, S., Kaeser, P.S., Janz, R., Sudhof, T.C., Siegelbaum, S.A. & Kandel, E.R. (2005) Genetic evidence for a protein-kinase-A-mediated presynaptic component in NMDA-receptor-dependent forms of long-term synaptic potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9365-9370.
- Huber, K.M. (2006) The fragile X-cerebellum connection. *Trends Neurosci*, **29**, 183-185.
- Huber, K.M., Gallagher, S.M., Warren, S.T. & Bear, M.F. (2002) Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7746-7750.
- Ibrahim, B.M. & Abdel-Rahman, A.A. (2015) A pivotal role for enhanced brainstem Orexin receptor 1 signaling in the central cannabinoid receptor 1-mediated pressor response in conscious rats. *Brain Res*, **1622**, 51-63.
- Ifrim, M.F., Williams, K.R. & Bassell, G.J. (2015) Single-Molecule Imaging of PSD-95 mRNA Translation in Dendrites and Its Dysregulation in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *J Neurosci*, **35**, 7116-7130.
- Imig, C., Min, S.W., Krinner, S., Arancillo, M., Rosenmund, C., Sudhof, T.C., Rhee, J., Brose, N. & Cooper, B.H. (2014) The morphological and molecular nature of synaptic vesicle priming at presynaptic active zones. *Neuron*, **84**, 416-431.
- Ivanco, T.L. & Greenough, W.T. (2002) Altered mossy fiber distributions in adult Fmr1 (FVB) knockout mice. *Hippocampus*, **12**, 47-54.
- Jahn, R. & Scheller, R.H. (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 631-643.

- Jarvis, S.E. & Zamponi, G.W. (2001) Distinct molecular determinants govern syntaxin 1A-mediated inactivation and G-protein inhibition of N-type calcium channels. *J Neurosci*, **21**, 2939-2948.
- Jeon, S.J., Seo, J.E., Yang, S.I., Choi, J.W., Wells, D., Shin, C.Y. & Ko, K.H. (2011) Cellular stress-induced up-regulation of FMRP promotes cell survival by modulating PI3K-Akt phosphorylation cascades. *J Biomed Sci*, **18**, 17.
- Ji, X.H., Cao, X.H., Zhang, C.L., Feng, Z.J., Zhang, X.H., Ma, L. & Li, B.M. (2008) Pre- and postsynaptic beta-adrenergic activation enhances excitatory synaptic transmission in layer V/VI pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex of rats. *Cereb Cortex*, **18**, 1506-1520.
- Jingami, H., Nakanishi, S. & Morikawa, K. (2003) Structure of the metabotropic glutamate receptor. *Curr Opin Neurobiol*, **13**, 271-278.
- Jockusch, W.J., Speidel, D., Sigler, A., Sorensen, J.B., Varoqueaux, F., Rhee, J.S. & Brose, N. (2007) CAPS-1 and CAPS-2 are essential synaptic vesicle priming proteins. *Cell*, **131**, 796-808.
- Jones, O.D. (2017) Do group I metabotropic glutamate receptors mediate LTD? *Neurobiol Learn Mem*, **138**, 85-97.
- Jovanovic, J.N., Sihra, T.S., Nairn, A.C., Hemmings, H.C., Jr., Greengard, P. & Czernik, A.J. (2001) Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin I during Ca²⁺-dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *J Neurosci*, **21**, 7944-7953.
- Jung, K.M., Astarita, G., Zhu, C., Wallace, M., Mackie, K. & Piomelli, D. (2007) A key role for diacylglycerol lipase- α in metabotropic glutamate receptor-dependent endocannabinoid mobilization. *Mol Pharmacol*, **72**, 612-621.
- Jung, K.M., Sepers, M., Henstridge, C.M., Lassalle, O., Neuhofer, D., Martin, H., Ginger, M., Frick, A., DiPatrizio, N.V., Mackie, K., Katona, I., Piomelli, D. & Manzoni, O.J. (2012) Uncoupling of the endocannabinoid signalling complex in a mouse model of fragile X syndrome. *Nat Commun*, **3**, 1080.
- Junge, H.J., Rhee, J.S., Jahn, O., Varoqueaux, F., Spiess, J., Waxham, M.N., Rosenmund, C. & Brose, N. (2004) Calmodulin and Munc13 form a Ca²⁺ sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity. *Cell*, **118**, 389-401.

- Kaesler-Woo, Y.J., Yang, X. & Sudhof, T.C. (2012) C-terminal complexin sequence is selectively required for clamping and priming but not for Ca²⁺ triggering of synaptic exocytosis. *J Neurosci*, **32**, 2877-2885.
- Kaesler, P.S. (2011) Pushing synaptic vesicles over the RIM. *Cell Logist*, **1**, 106-110.
- Kaesler, P.S., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J. & Sudhof, T.C. (2011) RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell*, **144**, 282-295.
- Kaesler, P.S., Kwon, H.B., Blundell, J., Chevalere, V., Morishita, W., Malenka, R.C., Powell, C.M., Castillo, P.E. & Sudhof, T.C. (2008a) RIM1alpha phosphorylation at serine-413 by protein kinase A is not required for presynaptic long-term plasticity or learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 14680-14685.
- Kaesler, P.S., Kwon, H.B., Chiu, C.Q., Deng, L., Castillo, P.E. & Sudhof, T.C. (2008b) RIM1alpha and RIM1beta are synthesized from distinct promoters of the RIM1 gene to mediate differential but overlapping synaptic functions. *J Neurosci*, **28**, 13435-13447.
- Kaesler, P.S. & Regehr, W.G. (2014) Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release. *Annu Rev Physiol*, **76**, 333-363.
- Kaesler, P.S. & Sudhof, T.C. (2005) RIM function in short- and long-term synaptic plasticity. *Biochem Soc Trans*, **33**, 1345-1349.
- Kammermeier, P.J. (2015) Constitutive activity of metabotropic glutamate receptor 7. *BMC Neurosci*, **16**, 17.
- Kamp, M.A., Hanggi, D., Steiger, H.J. & Schneider, T. (2012) Diversity of presynaptic calcium channels displaying different synaptic properties. *Rev Neurosci*, **23**, 179-190.
- Kandel, T.M.J.J.H.S.E.R. (2000) *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill, New York.
- Kaneko, M. & Takahashi, T. (2004) Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation. *J Neurosci*, **24**, 5202-5208.
- Kanellopoulos, A.K., Semelidou, O., Kotini, A.G., Anezaki, M. & Skoulakis, E.M. (2012) Learning and memory deficits consequent to reduction of the fragile X mental retardation protein result from metabotropic glutamate receptor-mediated inhibition of cAMP signaling in *Drosophila*. *J Neurosci*, **32**, 13111-13124.

- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M. & Watanabe, M. (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev*, **89**, 309-380.
- Kao, D.I., Aldridge, G.M., Weiler, I.J. & Greenough, W.T. (2010) Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 15601-15606.
- Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T., Ozaki, N., Miyazaki, M., Yano, H. & Seino, S. (2001) Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J Biol Chem*, **276**, 46046-46053.
- Katona, I., Urban, G.M., Wallace, M., Ledent, C., Jung, K.M., Piomelli, D., Mackie, K. & Freund, T.F. (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*, **26**, 5628-5637.
- Kauppinen, R.A. & Nicholls, D.G. (1986) Synaptosomal bioenergetics. The role of glycolysis, pyruvate oxidation and responses to hypoglycaemia. *Eur J Biochem*, **158**, 159-165.
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochizuki, N., Toki, S., Nakaya, M., Matsuda, M., Housman, D.E. & Graybiel, A.M. (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*, **282**, 2275-2279.
- Kelley, D.J., Bhattacharyya, A., Lahvis, G.P., Yin, J.C., Malter, J. & Davidson, R.J. (2008) The cyclic AMP phenotype of fragile X and autism. *Neurosci Biobehav Rev*, **32**, 1533-1543.
- Kelley, D.J., Davidson, R.J., Elliott, J.L., Lahvis, G.P., Yin, J.C. & Bhattacharyya, A. (2007) The cyclic AMP cascade is altered in the fragile X nervous system. *PLoS One*, **2**, e931.
- Kho, D.T., Glass, M. & Graham, E.S. (2017) Is the Cannabinoid CB2 Receptor a Major Regulator of the Neuroinflammatory Axis of the Neurovascular Unit in Humans? *Adv Pharmacol*, **80**, 367-396.
- Kisilevsky, A.E. & Zamponi, G.W. (2008) Presynaptic calcium channels: structure, regulators, and blockers. *Handb Exp Pharmacol*, 45-75.
- Klar, R., Walker, A.G., Ghose, D., Grueter, B.A., Engers, D.W., Hopkins, C.R., Lindsley, C.W., Xiang, Z., Conn, P.J. & Niswender, C.M. (2015) Activation of

- Metabotropic Glutamate Receptor 7 Is Required for Induction of Long-Term Potentiation at SC-CA1 Synapses in the Hippocampus. *J Neurosci*, **35**, 7600-7615.
- Klemmer, P., Meredith, R.M., Holmgren, C.D., Klychnikov, O.I., Stahl-Zeng, J., Loos, M., van der Schors, R.C., Wortel, J., de Wit, H., Spijker, S., Rotaru, D.C., Mansvelder, H.D., Smit, A.B. & Li, K.W. (2011) Proteomics, ultrastructure, and physiology of hippocampal synapses in a fragile X syndrome mouse model reveal presynaptic phenotype. *J Biol Chem*, **286**, 25495-25504.
- Kniazeff, J., Bessis, A.S., Maurel, D., Ansanay, H., Prezeau, L. & Pin, J.P. (2004) Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 706-713.
- Kobayashi, M., Kojima, M., Koyanagi, Y., Adachi, K., Imamura, K. & Koshikawa, N. (2009) Presynaptic and postsynaptic modulation of glutamatergic synaptic transmission by activation of alpha(1)- and beta-adrenoceptors in layer V pyramidal neurons of rat cerebral cortex. *Synapse*, **63**, 269-281.
- Koekkoek, S.K., Yamaguchi, K., Milojkovic, B.A., Dortland, B.R., Ruigrok, T.J., Maex, R., De Graaf, W., Smit, A.E., VanderWerf, F., Bakker, C.E., Willemsen, R., Ikeda, T., Kakizawa, S., Onodera, K., Nelson, D.L., Mientjes, E., Joosten, M., De Schutter, E., Oostra, B.A., Ito, M. & De Zeeuw, C.I. (2005) Deletion of FMR1 in Purkinje cells enhances parallel fiber LTD, enlarges spines, and attenuates cerebellar eyelid conditioning in Fragile X syndrome. *Neuron*, **47**, 339-352.
- Koga, K., Descalzi, G., Chen, T., Ko, H.G., Lu, J., Li, S., Son, J., Kim, T., Kwak, C., Hugarir, R.L., Zhao, M.G., Kaang, B.K., Collingridge, G.L. & Zhuo, M. (2015a) Coexistence of Two Forms of LTP in ACC Provides a Synaptic Mechanism for the Interactions between Anxiety and Chronic Pain. *Neuron*, **86**, 1109.
- Koga, K., Liu, M.G., Qiu, S., Song, Q., O'Den, G., Chen, T. & Zhuo, M. (2015b) Impaired presynaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex of Fmr1 knock-out mice. *J Neurosci*, **35**, 2033-2043.
- Kolakowski, L.F., Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels*, **2**, 1-7.
- Kooy, R.F., D'Hooge, R., Reyniers, E., Bakker, C.E., Nagels, G., De Boule, K., Storm, K., Clincke, G., De Deyn, P.P., Oostra, B.A. & Willems, P.J. (1996) Transgenic mouse model for the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, **64**, 241-245.
- Kreitzer, A.C. & Regehr, W.G. (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, **29**, 717-727.

- Kristiansen, K. (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther*, **103**, 21-80.
- Krueger, D.D. & Bear, M.F. (2011) Toward fulfilling the promise of molecular medicine in fragile X syndrome. *Annu Rev Med*, **62**, 411-429.
- Ladera, C., Godino Mdel, C., Martin, R., Lujan, R., Shigemoto, R., Ciruela, F., Torres, M. & Sanchez-Prieto, J. (2007) The coexistence of multiple receptors in a single nerve terminal provides evidence for pre-synaptic integration. *J Neurochem*, **103**, 2314-2326.
- Laezza, F., Doherty, J.J. & Dingledine, R. (1999) Long-term depression in hippocampal interneurons: joint requirement for pre- and postsynaptic events. *Science*, **285**, 1411-1414.
- Lai, J.K., Sobala-Drozowski, M., Zhou, L., Doering, L.C., Faure, P.A. & Foster, J.A. (2014) Temporal and spectral differences in the ultrasonic vocalizations of fragile X knock out mice during postnatal development. *Behav Brain Res*, **259**, 119-130.
- Lakics, V., Karran, E.H. & Boess, F.G. (2010) Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology*, **59**, 367-374.
- Landis, S.C. & Bloom, F.E. (1975) Ultrastructural identification of noradrenergic boutons in mutant and normal mouse cerebellar cortex. *Brain Res*, **96**, 299-305.
- Le Guen, M.C. & De Zeeuw, C.I. (2010) Presynaptic plasticity at cerebellar parallel fiber terminals. *Funct Neurol*, **25**, 141-151.
- Lee, J.G., Choi, I.S., Park, E.J., Cho, J.H., Lee, M.G., Choi, B.J. & Jang, I.S. (2007) beta(2)-Adrenoceptor-mediated facilitation of glutamatergic transmission in rat ventromedial hypothalamic neurons. *Neuroscience*, **144**, 1255-1265.
- Leenders, A.G., Lopes da Silva, F.H., Ghijsen, W.E. & Verhage, M. (2001) Rab3a is involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals. *Mol Biol Cell*, **12**, 3095-3102.

- Levenes, C., Daniel, H., Soubrie, P. & Crepel, F. (1998) Cannabinoids decrease excitatory synaptic transmission and impair long-term depression in rat cerebellar Purkinje cells. *J Physiol*, **510** (Pt 3), 867-879.
- Li, C., Bassell, G.J. & Sasaki, Y. (2009) Fragile X Mental Retardation Protein is Involved in Protein Synthesis-Dependent Collapse of Growth Cones Induced by Semaphorin-3A. *Front Neural Circuits*, **3**, 11.
- Li, H., Li, Y., Shao, J., Li, R., Qin, Y., Xie, C. & Zhao, Z. (2008) The association analysis of RELN and GRM8 genes with autistic spectrum disorder in Chinese Han population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **147B**, 194-200.
- Li, L., Bischofberger, J. & Jonas, P. (2007) Differential gating and recruitment of P/Q-, N-, and R-type Ca²⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *J Neurosci*, **27**, 13420-13429.
- Liem, L.K., Simard, J.M., Song, Y. & Tewari, K. (1995) The patch clamp technique. *Neurosurgery*, **36**, 382-392.
- Limbach, C., Laue, M.M., Wang, X., Hu, B., Thiede, N., Hultqvist, G. & Kilimann, M.W. (2011) Molecular in situ topology of Aczonin/Piccolo and associated proteins at the mammalian neurotransmitter release site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, E392-401.
- Lipstein, N., Schaks, S., Dimova, K., Kalkhof, S., Ihling, C., Kolbel, K., Ashery, U., Rhee, J., Brose, N., Sinz, A. & Jahn, O. (2012) Nonconserved Ca(2+)/calmodulin binding sites in Munc13s differentially control synaptic short-term plasticity. *Mol Cell Biol*, **32**, 4628-4641.
- Liu, B., Li, Y., Stackpole, E.E., Novak, A., Gao, Y., Zhao, Y., Zhao, X. & Richter, J.D. (2018) Regulatory discrimination of mRNAs by FMRP controls mouse adult neural stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **115**, E11397-E11405.
- Liu, H., Enyeart, J.A. & Enyeart, J.J. (2008) ACTH inhibits bTREK-1 K⁺ channels through multiple cAMP-dependent signaling pathways. *J Gen Physiol*, **132**, 279-294.
- Liu, Y., Zhang, Y., Zhao, D., Dong, R., Yang, X., Tammimies, K., Uddin, M., Scherer, S.W. & Gai, Z. (2015) Rare de novo deletion of metabotropic glutamate receptor 7 (GRM7) gene in a patient with autism spectrum disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **168B**, 258-264.

- Lohith, T.G., Osterweil, E.K., Fujita, M., Jenko, K.J., Bear, M.F. & Innis, R.B. (2013) Is metabotropic glutamate receptor 5 upregulated in prefrontal cortex in fragile X syndrome? *Mol Autism*, **4**, 15.
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, **248**, 1547-1550.
- Lonart, G., Schoch, S., Kaeser, P.S., Larkin, C.J., Sudhof, T.C. & Linden, D.J. (2003) Phosphorylation of RIM1alpha by PKA triggers presynaptic long-term potentiation at cerebellar parallel fiber synapses. *Cell*, **115**, 49-60.
- Lopez-Bendito, G., Shigemoto, R., Fairen, A. & Lujan, R. (2002) Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development. *Cereb Cortex*, **12**, 625-638.
- Lu, J., Li, H., Wang, Y., Sudhof, T.C. & Rizo, J. (2005) Solution structure of the RIM1alpha PDZ domain in complex with an ELKS1b C-terminal peptide. *J Mol Biol*, **352**, 455-466.
- Lucchesi, O., Ruete, M.C., Bustos, M.A., Quevedo, M.F. & Tomes, C.N. (2016) The signaling module cAMP/Epac/Rap1/PLCepsilon/IP3 mobilizes acrosomal calcium during sperm exocytosis. *Biochim Biophys Acta*, **1863**, 544-561.
- Ly, R., Bouvier, G., Schonewille, M., Arabo, A., Rondi-Reig, L., Lena, C., Casado, M., De Zeeuw, C.I. & Feltz, A. (2013) T-type channel blockade impairs long-term potentiation at the parallel fiber-Purkinje cell synapse and cerebellar learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 20302-20307.
- Llano, I., Leresche, N. & Marty, A. (1991) Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron*, **6**, 565-574.
- Ma, C., Li, W., Xu, Y. & Rizo, J. (2011) Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 542-549.
- Ma, C., Su, L., Seven, A.B., Xu, Y. & Rizo, J. (2013) Reconstitution of the vital functions of Munc18 and Munc13 in neurotransmitter release. *Science*, **339**, 421-425.
- Maccarrone, M., Rossi, S., Bari, M., De Chiara, V., Rapino, C., Musella, A., Bernardi, G., Bagni, C. & Centonze, D. (2010) Abnormal mGlu 5 receptor/endocannabinoid

- coupling in mice lacking FMRP and BC1 RNA. *Neuropsychopharmacology*, **35**, 1500-1509.
- Macek, T.A., Schaffhauser, H. & Conn, P.J. (1998) Protein kinase C and A3 adenosine receptor activation inhibit presynaptic metabotropic glutamate receptor (mGluR) function and uncouple mGluRs from GTP-binding proteins. *J Neurosci*, **18**, 6138-6146.
- Maejima, T., Hashimoto, K., Yoshida, T., Aiba, A. & Kano, M. (2001) Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron*, **31**, 463-475.
- Maejima, T., Oka, S., Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Aiba, A., Wu, D., Waku, K., Sugiura, T. & Kano, M. (2005) Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca²⁺-assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase C β 4 signaling cascade in the cerebellum. *J Neurosci*, **25**, 6826-6835.
- Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgansberger, W., Di Marzo, V. & Lutz, B. (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*, **418**, 530-534.
- Martin, B.S. & Huntsman, M.M. (2012) Pathological plasticity in fragile X syndrome. *Neural Plast*, **2012**, 275630.
- Martin, R., Durroux, T., Ciruela, F., Torres, M., Pin, J.P. & Sanchez-Prieto, J. (2010) The metabotropic glutamate receptor mGlu7 activates phospholipase C, translocates munc-13-1 protein, and potentiates glutamate release at cerebrocortical nerve terminals. *J Biol Chem*, **285**, 17907-17917.
- Martin, R., Ferrero, J.J., Collado-Alsina, A., Aguado, C., Lujan, R., Torres, M. & Sanchez-Prieto, J. (2018) Bidirectional modulation of glutamatergic synaptic transmission by metabotropic glutamate type 7 receptors at Schaffer collateral-CA1 hippocampal synapses. *J Physiol*, **596**, 921-940.
- Martin, R., Ladera, C., Bartolome-Martin, D., Torres, M. & Sanchez-Prieto, J. (2008) The inhibition of release by mGlu7 receptors is independent of the Ca²⁺ channel type but associated to GABAB and adenosine A1 receptors. *Neuropharmacology*, **55**, 464-473.
- Martin, R., Torres, M. & Sanchez-Prieto, J. (2007) mGluR7 inhibits glutamate release through a PKC-independent decrease in the activity of P/Q-type Ca²⁺ channels

- and by diminishing cAMP in hippocampal nerve terminals. *Eur J Neurosci*, **26**, 312-322.
- Mateos, J.M., Benitez, R., Elezgarai, I., Azkue, J.J., Lazaro, E., Osorio, A., Bilbao, A., Donate, F., Sarria, R., Conquet, F., Ferraguti, F., Kuhn, R., Knopfel, T. & Grandes, P. (2000) Immunolocalization of the mGluR1b splice variant of the metabotropic glutamate receptor 1 at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the rat cerebellar cortex. *J Neurochem*, **74**, 1301-1309.
- Maurin, T. & Bardoni, B. (2018) Fragile X Mental Retardation Protein: To Be or Not to Be a Translational Enhancer. *Front Mol Biosci*, **5**, 113.
- Maurin, T., Lebrigand, K., Castagnola, S., Paquet, A., Jarjat, M., Popa, A., Grossi, M., Rage, F. & Bardoni, B. (2018a) HITS-CLIP in various brain areas reveals new targets and new modalities of RNA binding by fragile X mental retardation protein. *Nucleic Acids Res*, **46**, 6344-6355.
- Maurin, T., Melancia, F., Jarjat, M., Castro, L., Costa, L., Delhay, S., Khayachi, A., Castagnola, S., Mota, E., Di Giorgio, A., Servadio, M., Drozd, M., Poupon, G., Schiavi, S., Sardone, L., Azoulay, S., Ciranna, L., Martin, S., Vincent, P., Trezza, V. & Bardoni, B. (2018b) Involvement of Phosphodiesterase 2A Activity in the Pathophysiology of Fragile X Syndrome. *Cereb Cortex*.
- Maximov, A., Shin, O.H., Liu, X. & Sudhof, T.C. (2007) Synaptotagmin-12, a synaptic vesicle phosphoprotein that modulates spontaneous neurotransmitter release. *J Cell Biol*, **176**, 113-124.
- McBride, S.M., Choi, C.H., Wang, Y., Liebelt, D., Braunstein, E., Ferreira, D., Sehgal, A., Siwicki, K.K., Dockendorff, T.C., Nguyen, H.T., McDonald, T.V. & Jongens, T.A. (2005) Pharmacological rescue of synaptic plasticity, courtship behavior, and mushroom body defects in a *Drosophila* model of fragile X syndrome. *Neuron*, **45**, 753-764.
- McDonough, S.I., Mintz, I.M. & Bean, B.P. (1997) Alteration of P-type calcium channel gating by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Biophys J*, **72**, 2117-2128.
- McMahon, H.T., Barrie, A.P., Lowe, M. & Nicholls, D.G. (1989) Glutamate release from guinea-pig synaptosomes: stimulation by reuptake-induced depolarization. *J Neurochem*, **53**, 71-79.
- McMahon, H.T., Kozlov, M.M. & Martens, S. (2010) Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond. *Cell*, **140**, 601-605.

- McMahon, H.T. & Nicholls, D.G. (1991) Transmitter glutamate release from isolated nerve terminals: evidence for biphasic release and triggering by localized Ca^{2+} . *J Neurochem*, **56**, 86-94.
- Melancia, F. & Trezza, V. (2018) Modelling Fragile X syndrome in the laboratory setting: a behavioral perspective. *Behav Brain Res*.
- Menegon, A., Bonanomi, D., Albertinazzi, C., Lotti, F., Ferrari, G., Kao, H.T., Benfenati, F., Baldelli, P. & Valtorta, F. (2006) Protein kinase A-mediated synapsin I phosphorylation is a central modulator of Ca^{2+} -dependent synaptic activity. *J Neurosci*, **26**, 11670-11681.
- Mercier, J.F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A. & Bouvier, M. (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, **277**, 44925-44931.
- Michalon, A., Bruns, A., Risterucci, C., Honer, M., Ballard, T.M., Ozmen, L., Jaeschke, G., Wettstein, J.G., von Kienlin, M., Kunnecke, B. & Lindemann, L. (2014) Chronic metabotropic glutamate receptor 5 inhibition corrects local alterations of brain activity and improves cognitive performance in fragile X mice. *Biol Psychiatry*, **75**, 189-197.
- Michalon, A., Sidorov, M., Ballard, T.M., Ozmen, L., Spooren, W., Wettstein, J.G., Jaeschke, G., Bear, M.F. & Lindemann, L. (2012) Chronic pharmacological mGlu5 inhibition corrects fragile X in adult mice. *Neuron*, **74**, 49-56.
- Mila M, A.-M.M., Madrigal I, Rodriguez-Revenge L (2017) Fragile X syndrome: An overview and update of the FMR1 gene. *Clinical Genetics*, 9.
- Millan, C., Castro, E., Torres, M., Shigemoto, R. & Sanchez-Prieto, J. (2003a) Co-expression of metabotropic glutamate receptor 7 and N-type Ca^{2+} channels in single cerebrocortical nerve terminals of adult rats. *J Biol Chem*, **278**, 23955-23962.
- Millan, C., Lujan, R., Shigemoto, R. & Sanchez-Prieto, J. (2002a) The inhibition of glutamate release by metabotropic glutamate receptor 7 affects both $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and cAMP: evidence for a strong reduction of Ca^{2+} entry in single nerve terminals. *J Biol Chem*, **277**, 14092-14101.
- Millan, C., Lujan, R., Shigemoto, R. & Sanchez-Prieto, J. (2002b) Subtype-specific expression of group III metabotropic glutamate receptors and Ca^{2+} channels in single nerve terminals. *J Biol Chem*, **277**, 47796-47803.

- Millan, C., Torres, M. & Sanchez-Prieto, J. (2003b) Co-activation of PKA and PKC in cerebrocortical nerve terminals synergistically facilitates glutamate release. *J Neurochem*, **87**, 1101-1111.
- Mines, M.A., Yuskaitis, C.J., King, M.K., Beurel, E. & Jope, R.S. (2010) GSK3 influences social preference and anxiety-related behaviors during social interaction in a mouse model of fragile X syndrome and autism. *PLoS One*, **5**, e9706.
- Mittelstaedt, T., Alvarez-Baron, E. & Schoch, S. (2010) RIM proteins and their role in synapse function. *Biol Chem*, **391**, 599-606.
- Mochida, S. (2018) Presynaptic calcium channels. *Neurosci Res*, **127**, 33-44.
- Morales, J., Hiesinger, P.R., Schroeder, A.J., Kume, K., Verstreken, P., Jackson, F.R., Nelson, D.L. & Hassan, B.A. (2002) Drosophila fragile X protein, DFXR, regulates neuronal morphology and function in the brain. *Neuron*, **34**, 961-972.
- Morales, P. & Reggio, P.H. (2017) An Update on Non-CB1, Non-CB2 Cannabinoid Related G-Protein-Coupled Receptors. *Cannabis Cannabinoid Res*, **2**, 265-273.
- Moulder, K.L., Jiang, X., Chang, C., Taylor, A.A., Benz, A.M., Conti, A.C., Muglia, L.J. & Mennerick, S. (2008) A specific role for Ca²⁺-dependent adenylyl cyclases in recovery from adaptive presynaptic silencing. *J Neurosci*, **28**, 5159-5168.
- Muddashetty, R.S., Nalavadi, V.C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., Warren, S.T. & Bassell, G.J. (2011) Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling. *Mol Cell*, **42**, 673-688.
- Muguruza, C., Meana, J.J. & Callado, L.F. (2016) Group II Metabotropic Glutamate Receptors as Targets for Novel Antipsychotic Drugs. *Front Pharmacol*, **7**, 130.
- Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K. & Jingami, H. (2007) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the ligand-binding domain of metabotropic glutamate receptor 7. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, **63**, 627-630.
- Myoga, M.H. & Regehr, W.G. (2011) Calcium microdomains near R-type calcium channels control the induction of presynaptic long-term potentiation at parallel fiber to purkinje cell synapses. *J Neurosci*, **31**, 5235-5243.
- Myrick, L.K., Deng, P.Y., Hashimoto, H., Oh, Y.M., Cho, Y., Poidevin, M.J., Suhl, J.A., Visootsak, J., Cavalli, V., Jin, P., Cheng, X., Warren, S.T. & Klyachko, V.A. (2015)

- Independent role for presynaptic FMRP revealed by an FMR1 missense mutation associated with intellectual disability and seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, 949-956.
- Nagy, G., Reim, K., Matti, U., Brose, N., Binz, T., Rettig, J., Neher, E. & Sorensen, J.B. (2004) Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron*, **41**, 417-429.
- Nevian, T. & Sakmann, B. (2006) Spine Ca²⁺ signaling in spike-timing-dependent plasticity. *J Neurosci*, **26**, 11001-11013.
- Nicholas, A.P., Hokfelt, T. & Pieribone, V.A. (1996) The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol Sci*, **17**, 245-255.
- Nicholls, D.G. (1989a) Regulation of calcium in isolated nerve terminals (synaptosomes): relationship to neurotransmitter release. *Ann N Y Acad Sci*, **568**, 81-88.
- Nicholls, D.G. (1989b) Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J Neurochem*, **52**, 331-341.
- Nicholls, D.G. & Sihra, T.S. (1986) Synaptosomes possess an exocytotic pool of glutamate. *Nature*, **321**, 772-773.
- Nicholls, D.G., Sihra, T.S. & Sanchez-Prieto, J. (1987) Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem*, **49**, 50-57.
- Nielsen, D.M., Derber, W.J., McClellan, D.A. & Crnic, L.S. (2002) Alterations in the auditory startle response in Fmr1 targeted mutant mouse models of fragile X syndrome. *Brain Res*, **927**, 8-17.
- Niimura, M., Miki, T., Shibasaki, T., Fujimoto, W., Iwanaga, T. & Seino, S. (2009) Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function. *J Cell Physiol*, **219**, 652-658.
- Niswender, C.M. & Conn, P.J. (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **50**, 295-322.
- Niswender, C.M., Johnson, K.A., Luo, Q., Ayala, J.E., Kim, C., Conn, P.J. & Weaver, C.D. (2008) A novel assay of Gi/o-linked G protein-coupled receptor coupling

- to potassium channels provides new insights into the pharmacology of the group III metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol*, **73**, 1213-1224.
- Nolze, A., Schneider, J., Keil, R., Lederer, M., Huttelmaier, S., Kessels, M.M., Qualmann, B. & Hatzfeld, M. (2013) FMRP regulates actin filament organization via the armadillo protein p0071. *RNA*, **19**, 1483-1496.
- Noroozi, R., Taheri, M., Movafagh, A., Mirfakhraie, R., Solgi, G., Sayad, A., Mazdeh, M. & Darvish, H. (2016) Glutamate receptor, metabotropic 7 (GRM7) gene variations and susceptibility to autism: A case-control study. *Autism Res*, **9**, 1161-1168.
- Nosyreva, E.D. & Huber, K.M. (2006) Metabotropic receptor-dependent long-term depression persists in the absence of protein synthesis in the mouse model of fragile X syndrome. *J Neurophysiol*, **95**, 3291-3295.
- Nunez, E., Benito, C., Pazos, M.R., Barbachano, A., Fajardo, O., Gonzalez, S., Tolon, R.M. & Romero, J. (2004) Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse*, **53**, 208-213.
- Nyiri, G., Cserep, C., Szabadits, E., Mackie, K. & Freund, T.F. (2005) CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience*, **136**, 811-822.
- O'Connor, V., El Far, O., Bofill-Cardona, E., Nanoff, C., Freissmuth, M., Karschin, A., Airas, J.M., Betz, H. & Boehm, S. (1999) Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling. *Science*, **286**, 1180-1184.
- O'Dell, T.J., Connor, S.A., Guglietta, R. & Nguyen, P.V. (2015) beta-Adrenergic receptor signaling and modulation of long-term potentiation in the mammalian hippocampus. *Learn Mem*, **22**, 461-471.
- O'Hara, P.J., Sheppard, P.O., Thogersen, H., Venezia, D., Haldeman, B.A., McGrane, V., Houamed, K.M., Thomsen, C., Gilbert, T.L. & Mulvihill, E.R. (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron*, **11**, 41-52.
- Oddi, D., Crusio, W.E., D'Amato, F.R. & Pietropaolo, S. (2013) Monogenic mouse models of social dysfunction: implications for autism. *Behav Brain Res*, **251**, 75-84.

- Ohishi, H., Neki, A. & Mizuno, N. (1998) Distribution of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat and mouse: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci Res*, **30**, 65-82.
- Okamoto, N., Hori, S., Akazawa, C., Hayashi, Y., Shigemoto, R., Mizuno, N. & Nakanishi, S. (1994) Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. *J Biol Chem*, **269**, 1231-1236.
- Omote, H., Miyaji, T., Juge, N. & Moriyama, Y. (2011) Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry*, **50**, 5558-5565.
- Ovsepian, S.V., Blazquez-Llorca, L., Freitag, S.V., Rodrigues, E.F. & Herms, J. (2017) Ambient Glutamate Promotes Paroxysmal Hyperactivity in Cortical Pyramidal Neurons at Amyloid Plaques via Presynaptic mGluR1 Receptors. *Cereb Cortex*, **27**, 4733-4749.
- Ozaki, N., Shibasaki, T., Kashima, Y., Miki, T., Takahashi, K., Ueno, H., Sunaga, Y., Yano, H., Matsuura, Y., Iwanaga, T., Takai, Y. & Seino, S. (2000) cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol*, **2**, 805-811.
- Padmashri, R., Reiner, B.C., Suresh, A., Spartz, E. & Dunaevsky, A. (2013) Altered structural and functional synaptic plasticity with motor skill learning in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*, **33**, 19715-19723.
- Palazzo, E., Marabese, I., de Novellis, V., Rossi, F. & Maione, S. (2016) Metabotropic Glutamate Receptor 7: From Synaptic Function to Therapeutic Implications. *Curr Neuropharmacol*, **14**, 504-513.
- Pan, X., Ikeda, S.R. & Lewis, D.L. (1996) Rat brain cannabinoid receptor modulates N-type Ca^{2+} channels in a neuronal expression system. *Mol Pharmacol*, **49**, 707-714.
- Pang, Z.P., Shin, O.H., Meyer, A.C., Rosenmund, C. & Sudhof, T.C. (2006a) A gain-of-function mutation in synaptotagmin-1 reveals a critical role of Ca^{2+} -dependent soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex binding in synaptic exocytosis. *J Neurosci*, **26**, 12556-12565.
- Pang, Z.P., Sun, J., Rizo, J., Maximov, A. & Sudhof, T.C. (2006b) Genetic analysis of synaptotagmin 2 in spontaneous and Ca^{2+} -triggered neurotransmitter release. *EMBO J*, **25**, 2039-2050.

- Paradee, W., Melikian, H.E., Rasmussen, D.L., Kenneson, A., Conn, P.J. & Warren, S.T. (1999) Fragile X mouse: strain effects of knockout phenotype and evidence suggesting deficient amygdala function. *Neuroscience*, **94**, 185-192.
- Park, J.H., Kim, S.J., Park, S.H., Son, D.G., Bae, J.H., Kim, H.K., Han, J. & Song, D.K. (2012) Glucagon-like peptide-1 enhances glucokinase activity in pancreatic beta-cells through the association of Epac2 with Rim2 and Rab3A. *Endocrinology*, **153**, 574-582.
- Park, K., Yi, J.H., Kim, H., Choi, K., Kang, S.J. & Shin, K.S. (2011) HCN channel activity-dependent modulation of inhibitory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala. *Biochem Biophys Res Commun*, **404**, 952-957.
- Parvin, S., Takeda, R., Sugiura, Y., Neyazaki, M., Nogi, T. & Sasaki, Y. (2018) Fragile X mental retardation protein regulates accumulation of the active zone protein Munc18-1 in presynapses via local translation in axons during synaptogenesis. *Neurosci Res*.
- Patel, T.B., Du, Z., Pierre, S., Cartin, L. & Scholich, K. (2001) Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene*, **269**, 13-25.
- Patzlaff, N.E., Shen, M. & Zhao, X. (2018) Regulation of Adult Neurogenesis by the Fragile X Family of RNA Binding Proteins. *Brain Plast*, **3**, 205-223.
- Peier, A.M., McIlwain, K.L., Kenneson, A., Warren, S.T., Paylor, R. & Nelson, D.L. (2000) (Over)correction of FMR1 deficiency with YAC transgenics: behavioral and physical features. *Hum Mol Genet*, **9**, 1145-1159.
- Pelkey, K.A., Lavezzari, G., Racca, C., Roche, K.W. & McBain, C.J. (2005) mGluR7 is a metaplastic switch controlling bidirectional plasticity of feedforward inhibition. *Neuron*, **46**, 89-102.
- Pelkey, K.A. & McBain, C.J. (2008) Target-cell-dependent plasticity within the mossy fibre-CA3 circuit reveals compartmentalized regulation of presynaptic function at divergent release sites. *J Physiol*, **586**, 1495-1502.
- Pelkey, K.A., Topolnik, L., Yuan, X.Q., Lacaille, J.C. & McBain, C.J. (2008) State-dependent cAMP sensitivity of presynaptic function underlies metaplasticity in a hippocampal feedforward inhibitory circuit. *Neuron*, **60**, 980-987.

- Perin, M.S., Fried, V.A., Mignery, G.A., Jahn, R. & Sudhof, T.C. (1990) Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature*, **345**, 260-263.
- Perroy, J., Prezeau, L., De Waard, M., Shigemoto, R., Bockaert, J. & Fagni, L. (2000) Selective blockade of P/Q-type calcium channels by the metabotropic glutamate receptor type 7 involves a phospholipase C pathway in neurons. *J Neurosci*, **20**, 7896-7904.
- Philipp, M. & Hein, L. (2004) Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacol Ther*, **101**, 65-74.
- Piccinin, S., Cinque, C., Calo, L., Molinaro, G., Battaglia, G., Maggi, L., Nicoletti, F., Melchiorri, D., Eusebi, F., Massey, P.V. & Bashir, Z.I. (2010) Interaction between Ephrins and mGlu5 metabotropic glutamate receptors in the induction of long-term synaptic depression in the hippocampus. *J Neurosci*, **30**, 2835-2843.
- Pilpel, Y., Kollek, A., Berberich, S., Ginger, M., Frick, A., Mientjes, E., Oostra, B.A. & Seeburg, P.H. (2009) Synaptic ionotropic glutamate receptors and plasticity are developmentally altered in the CA1 field of Fmr1 knockout mice. *J Physiol*, **587**, 787-804.
- Pinheiro, P.S. & Mulle, C. (2008) Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci*, **9**, 423-436.
- Pisani, A., Gubellini, P., Bonsi, P., Conquet, F., Picconi, B., Centonze, D., Bernardi, G. & Calabresi, P. (2001) Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons. *Neuroscience*, **106**, 579-587.
- Pitler, T.A. & Alger, B.E. (1992) Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA_A responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci*, **12**, 4122-4132.
- Pitler, T.A. & Alger, B.E. (1994) Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism. *Neuron*, **13**, 1447-1455.
- Poirier, M.A., Xiao, W., Macosko, J.C., Chan, C., Shin, Y.K. & Bennett, M.K. (1998) The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. *Nat Struct Biol*, **5**, 765-769.

- Pozzi, D., Corradini, I. & Matteoli, M. (2018) The Control of Neuronal Calcium Homeostasis by SNAP-25 and its Impact on Neurotransmitter Release. *Neuroscience*.
- Qin, M., Huang, T., Kader, M., Krych, L., Xia, Z., Burlin, T., Zeidler, Z., Zhao, T. & Smith, C.B. (2015a) R-Baclofen Reverses a Social Behavior Deficit and Elevated Protein Synthesis in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Int J Neuropsychopharmacol*, **18**.
- Qin, M., Zeidler, Z., Moulton, K., Krych, L., Xia, Z. & Smith, C.B. (2015b) Endocannabinoid-mediated improvement on a test of aversive memory in a mouse model of fragile X syndrome. *Behav Brain Res*, **291**, 164-171.
- Ramirez-Franco, J., Bartolome-Martin, D., Alonso, B., Torres, M. & Sanchez-Prieto, J. (2014) Cannabinoid type 1 receptors transiently silence glutamatergic nerve terminals of cultured cerebellar granule cells. *PLoS One*, **9**, e88594.
- Ramos, B.P., Colgan, L., Nou, E., Ovadia, S., Wilson, S.R. & Arnsten, A.F. (2005) The beta-1 adrenergic antagonist, betaxolol, improves working memory performance in rats and monkeys. *Biol Psychiatry*, **58**, 894-900.
- Rehmann, H. (2013) Epac-inhibitors: facts and artefacts. *Sci Rep*, **3**, 3032.
- Rehmann, H., Arias-Palomo, E., Hadders, M.A., Schwede, F., Llorca, O. & Bos, J.L. (2008) Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B. *Nature*, **455**, 124-127.
- Reiner, A. & Levitz, J. (2018) Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron*, **98**, 1080-1098.
- Reisenberg, M., Singh, P.K., Williams, G. & Doherty, P. (2012) The diacylglycerol lipases: structure, regulation and roles in and beyond endocannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **367**, 3264-3275.
- Restivo, L., Ferrari, F., Passino, E., Sgobio, C., Bock, J., Oostra, B.A., Bagni, C. & Ammassari-Teule, M. (2005) Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11557-11562.
- Rhee, J.S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoqueaux, F., Augustin, I., Hesse, D., Sudhof, T.C., Takahashi, M., Rosenmund, C. & Brose, N. (2002) Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell*, **108**, 121-133.

- Rhee, M.H., Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R. & Vogel, Z. (1998) Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem*, **71**, 1525-1534.
- Ribeiro, F.M., Paquet, M., Cregan, S.P. & Ferguson, S.S. (2010) Group I metabotropic glutamate receptor signalling and its implication in neurological disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **9**, 574-595.
- Ringheim, G.E. & Taylor, S.S. (1990) Dissecting the domain structure of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I and elucidating the role of MgATP. *J Biol Chem*, **265**, 4800-4808.
- Rizo, J. (2018) Mechanism of neurotransmitter release coming into focus. *Protein Sci*, **27**, 1364-1391.
- Rizzoli, S.O. & Betz, W.J. (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 57-69.
- Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J. & Manzoni, O.J. (2002) Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8384-8388.
- Robichaux, W.G., 3rd & Cheng, X. (2018) Intracellular cAMP Sensor EPAC: Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics Development. *Physiol Rev*, **98**, 919-1053.
- Rodriguez-Moreno, A. & Paulsen, O. (2008) Spike timing-dependent long-term depression requires presynaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci*, **11**, 744-745.
- Rondard, P. & Pin, J.P. (2015) Dynamics and modulation of metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Pharmacol*, **20**, 95-101.
- Ronesi, J., Gerdeman, G.L. & Lovinger, D.M. (2004) Disruption of endocannabinoid release and striatal long-term depression by postsynaptic blockade of endocannabinoid membrane transport. *J Neurosci*, **24**, 1673-1679.
- Rosenbrock, H., Kramer, G., Hobson, S., Koros, E., Grundl, M., Grauert, M., Reymann, K.G. & Schroder, U.H. (2010) Functional interaction of metabotropic glutamate receptor 5 and NMDA-receptor by a metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulator. *Eur J Pharmacol*, **639**, 40-46.
- Rosenmund, C., Sigler, A., Augustin, I., Reim, K., Brose, N. & Rhee, J.S. (2002) Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron*, **33**, 411-424.

- Rosenmund, C. & Stevens, C.F. (1996) Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, **16**, 1197-1207.
- Rotschafer, S.E., Trujillo, M.S., Dansie, L.E., Ethell, I.M. & Razak, K.A. (2012) Minocycline treatment reverses ultrasonic vocalization production deficit in a mouse model of Fragile X Syndrome. *Brain Res*, **1439**, 7-14.
- Roy, S., Watkins, N. & Heck, D. (2012) Comprehensive analysis of ultrasonic vocalizations in a mouse model of fragile X syndrome reveals limited, call type specific deficits. *PLoS One*, **7**, e44816.
- Roy, S., Zhao, Y., Allensworth, M., Farook, M.F., LeDoux, M.S., Reiter, L.T. & Heck, D.H. (2011) Comprehensive motor testing in Fmr1-KO mice exposes temporal defects in oromotor coordination. *Behav Neurosci*, **125**, 962-969.
- Russwurm, C., Zoidl, G., Koesling, D. & Russwurm, M. (2009) Dual acylation of PDE2A splice variant 3: targeting to synaptic membranes. *J Biol Chem*, **284**, 25782-25790.
- Sadana, R. & Dessauer, C.W. (2009) Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neurosignals*, **17**, 5-22.
- Safo, P.K., Cravatt, B.F. & Regehr, W.G. (2006) Retrograde endocannabinoid signaling in the cerebellar cortex. *Cerebellum*, **5**, 134-145.
- Safo, P.K. & Regehr, W.G. (2005) Endocannabinoids control the induction of cerebellar LTD. *Neuron*, **48**, 647-659.
- Salin, P.A., Malenka, R.C. & Nicoll, R.A. (1996) Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron*, **16**, 797-803.
- Salt, T.E. & Eaton, S.A. (1995) Distinct presynaptic metabotropic receptors for L-AP4 and CCG1 on GABAergic terminals: pharmacological evidence using novel alpha-methyl derivative mGluR antagonists, MAP4 and MCCG, in the rat thalamus in vivo. *Neuroscience*, **65**, 5-13.
- Sanchez-Prieto, J., Sihra, T.S. & Nicholls, D.G. (1987) Characterization of the exocytotic release of glutamate from guinea-pig cerebral cortical synaptosomes. *J Neurochem*, **49**, 58-64.

- Sansig, G., Bushell, T.J., Clarke, V.R., Rozov, A., Burnashev, N., Portet, C., Gasparini, F., Schmutz, M., Klebs, K., Shigemoto, R., Flor, P.J., Kuhn, R., Knoepfel, T., Schroeder, M., Hampson, D.R., Collett, V.J., Zhang, C., Duvoisin, R.M., Collingridge, G.L. & van Der Putten, H. (2001) Increased seizure susceptibility in mice lacking metabotropic glutamate receptor 7. *J Neurosci*, **21**, 8734-8745.
- Santoro, M.R., Bray, S.M. & Warren, S.T. (2012) Molecular mechanisms of fragile X syndrome: a twenty-year perspective. *Annu Rev Pathol*, **7**, 219-245.
- Santos, A.R., Kanellopoulos, A.K. & Bagni, C. (2014) Learning and behavioral deficits associated with the absence of the fragile X mental retardation protein: what a fly and mouse model can teach us. *Learn Mem*, **21**, 543-555.
- Sara, S.J. (2009) The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci*, **10**, 211-223.
- Sare, R.M., Levine, M. & Smith, C.B. (2016) Behavioral Phenotype of Fmr1 Knock-Out Mice during Active Phase in an Altered Light/Dark Cycle. *eNeuro*, **3**.
- Sare, R.M., Song, A., Loutaev, I., Cook, A., Maita, I., Lemons, A., Sheeler, C. & Smith, C.B. (2017) Negative Effects of Chronic Rapamycin Treatment on Behavior in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Front Mol Neurosci*, **10**, 452.
- Scott, I.D. & Nicholls, D.G. (1980) Energy transduction in intact synaptosomes. Influence of plasma-membrane depolarization on the respiration and membrane potential of internal mitochondria determined in situ. *Biochem J*, **186**, 21-33.
- Schikorski, T. & Stevens, C.F. (2001) Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nat Neurosci*, **4**, 391-395.
- Schley, M., Stander, S., Kerner, J., Vajkoczy, P., Schupfer, G., Dusch, M., Schmelz, M. & Konrad, C. (2009) Predominant CB2 receptor expression in endothelial cells of glioblastoma in humans. *Brain Res Bull*, **79**, 333-337.
- Schmidt, M., Evellin, S., Weernink, P.A., von Dorp, F., Rehmann, H., Lomasney, J.W. & Jakobs, K.H. (2001) A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat Cell Biol*, **3**, 1020-1024.
- Schneggenburger, R., Sakaba, T. & Neher, E. (2002) Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends Neurosci*, **25**, 206-212.

- Schoch, S., Castillo, P.E., Jo, T., Mukherjee, K., Geppert, M., Wang, Y., Schmitz, F., Malenka, R.C. & Sudhof, T.C. (2002) RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature*, **415**, 321-326.
- Schoepp, D.D., Jane, D.E. & Monn, J.A. (1999) Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, **38**, 1431-1476.
- Schoepp, D.D. & Johnson, B.G. (1993) Metabotropic glutamate receptor modulation of cAMP accumulation in the neonatal rat hippocampus. *Neuropharmacology*, **32**, 1359-1365.
- Schonewille, M., Belmeguenai, A., Koekkoek, S.K., Houtman, S.H., Boele, H.J., van Beugen, B.J., Gao, Z., Badura, A., Ohtsuki, G., Amerika, W.E., Hosy, E., Hoebeek, F.E., Elgersma, Y., Hansel, C. & De Zeeuw, C.I. (2010) Purkinje cell-specific knockout of the protein phosphatase PP2B impairs potentiation and cerebellar motor learning. *Neuron*, **67**, 618-628.
- Schoppa, N.E. & Westbrook, G.L. (1997) Modulation of mEPSCs in olfactory bulb mitral cells by metabotropic glutamate receptors. *J Neurophysiol*, **78**, 1468-1475.
- Sears, J.C., Choi, W.J. & Broadie, K. (2019) Fragile X Mental Retardation Protein positively regulates PKA anchor Rugose and PKA activity to control actin assembly in learning/memory circuitry. *Neurobiol Dis*, **127**, 53-64.
- Serajee, F.J., Zhong, H., Nabi, R. & Huq, A.H. (2003) The metabotropic glutamate receptor 8 gene at 7q31: partial duplication and possible association with autism. *J Med Genet*, **40**, e42.
- Shen, M., Piser, T.M., Seybold, V.S. & Thayer, S.A. (1996) Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci*, **16**, 4322-4334.
- Shenoy, S.K. & Lefkowitz, R.J. (2011) beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci*, **32**, 521-533.
- Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P.J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S. & Mizuno, N. (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci*, **17**, 7503-7522.

- Shigemoto, R., Kulik, A., Roberts, J.D., Ohishi, H., Nusser, Z., Kaneko, T. & Somogyi, P. (1996) Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone. *Nature*, **381**, 523-525.
- Shin, O.H., Lu, J., Rhee, J.S., Tomchick, D.R., Pang, Z.P., Wojcik, S.M., Camacho-Perez, M., Brose, N., Machius, M., Rizo, J., Rosenmund, C. & Sudhof, T.C. (2010) Munc13 C2B domain is an activity-dependent Ca²⁺ regulator of synaptic exocytosis. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 280-288.
- Sidorov, M.S., Auerbach, B.D. & Bear, M.F. (2013) Fragile X mental retardation protein and synaptic plasticity. *Mol Brain*, **6**, 15.
- Siksou, L., Triller, A. & Marty, S. (2009) An emerging view of presynaptic structure from electron microscopic studies. *J Neurochem*, **108**, 1336-1342.
- Smrcka, A.V., Brown, J.H. & Holz, G.G. (2012) Role of phospholipase Cepsilon in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell Signal*, **24**, 1333-1343.
- Snyder, E.M., Philpot, B.D., Huber, K.M., Dong, X., Fallon, J.R. & Bear, M.F. (2001) Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nat Neurosci*, **4**, 1079-1085.
- Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. & Rothman, J.E. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, **362**, 318-324.
- Staras, K. & Branco, T. (2010) Sharing vesicles between central presynaptic terminals: implications for synaptic function. *Front Synaptic Neurosci*, **2**, 20.
- Staras, K., Branco, T., Burden, J.J., Pozo, K., Darcy, K., Marra, V., Ratnayaka, A. & Goda, Y. (2010) A vesicle superpool spans multiple presynaptic terminals in hippocampal neurons. *Neuron*, **66**, 37-44.
- Stefani, M.R. & Moghaddam, B. (2010) Activation of type 5 metabotropic glutamate receptors attenuates deficits in cognitive flexibility induced by NMDA receptor blockade. *Eur J Pharmacol*, **639**, 26-32.
- Stephenson, D.T., Coskran, T.M., Kelly, M.P., Kleiman, R.J., Morton, D., O'Neill, S.M., Schmidt, C.J., Weinberg, R.J. & Menniti, F.S. (2012) The distribution of phosphodiesterase 2A in the rat brain. *Neuroscience*, **226**, 145-155.
- Stephenson, D.T., Coskran, T.M., Wilhelms, M.B., Adamowicz, W.O., O'Donnell, M.M., Muravnick, K.B., Menniti, F.S., Kleiman, R.J. & Morton, D. (2009)

- Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species. *J Histochem Cytochem*, **57**, 933-949.
- Ster, J., de Bock, F., Bertaso, F., Abitbol, K., Daniel, H., Bockaert, J. & Fagni, L. (2009) Epac mediates PACAP-dependent long-term depression in the hippocampus. *J Physiol*, **587**, 101-113.
- Ster, J., De Bock, F., Guerineau, N.C., Janossy, A., Barrere-Lemaire, S., Bos, J.L., Bockaert, J. & Fagni, L. (2007) Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 2519-2524.
- Storm, D.R., Hansel, C., Hacker, B., Parent, A. & Linden, D.J. (1998) Impaired cerebellar long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice. *Neuron*, **20**, 1199-1210.
- Straiker, A., Min, K.T. & Mackie, K. (2013) Fmr1 deletion enhances and ultimately desensitizes CB(1) signaling in autaptic hippocampal neurons. *Neurobiol Dis*, **56**, 1-5.
- Sudhof, T.C. (2012) The presynaptic active zone. *Neuron*, **75**, 11-25.
- Sudhof, T.C. (2013) Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, **80**, 675-690.
- Sudhof, T.C. (2014) The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, **53**, 12696-12717.
- Sudhof, T.C. & Rizo, J. (2011) Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**.
- Sukoff Rizzo, S.J., Leonard, S.K., Gilbert, A., Dollings, P., Smith, D.L., Zhang, M.Y., Di, L., Platt, B.J., Neal, S., Dwyer, J.M., Bender, C.N., Zhang, J., Lock, T., Kowal, D., Kramer, A., Randall, A., Huselton, C., Vishwanathan, K., Tse, S.Y., Butera, J., Ring, R.H., Rosenzweig-Lipson, S., Hughes, Z.A. & Dunlop, J. (2011) The metabotropic glutamate receptor 7 allosteric modulator AMN082: a monoaminergic agent in disguise? *J Pharmacol Exp Ther*, **338**, 345-352.
- Suzuki, E. & Okada, T. (2010) Group I metabotropic glutamate receptors are involved in TEA-induced long-term potentiation at mossy fiber-CA3 synapses in the rat hippocampus. *Brain Res*, **1313**, 45-52.

- Suzuki, G., Tsukamoto, N., Fushiki, H., Kawagishi, A., Nakamura, M., Kurihara, H., Mitsuya, M., Ohkubo, M. & Ohta, H. (2007) In vitro pharmacological characterization of novel isoxazolopyridone derivatives as allosteric metabotropic glutamate receptor 7 antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*, **323**, 147-156.
- Szabo, G.G., Lenkey, N., Holderith, N., Andrasi, T., Nusser, Z. & Hajos, N. (2014) Presynaptic calcium channel inhibition underlies CB(1) cannabinoid receptor-mediated suppression of GABA release. *J Neurosci*, **34**, 7958-7963.
- Tabb, J.S., Kish, P.E., Van Dyke, R. & Ueda, T. (1992) Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem*, **267**, 15412-15418.
- Tabet, R., Moutin, E., Becker, J.A., Heintz, D., Fouillen, L., Flatter, E., Krezel, W., Alunni, V., Koebel, P., Dembele, D., Tassone, F., Bardoni, B., Mandel, J.L., Vitale, N., Muller, D., Le Merrer, J. & Moine, H. (2016a) Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) controls diacylglycerol kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **113**, E3619-3628.
- Tabet, R., Vitale, N. & Moine, H. (2016b) Fragile X syndrome: Are signaling lipids the missing culprits? *Biochimie*, **130**, 188-194.
- Tabolacci, E., Palumbo, F., Nobile, V. & Neri, G. (2016) Transcriptional Reactivation of the FMR1 Gene. A Possible Approach to the Treatment of the Fragile X Syndrome. *Genes (Basel)*, **7**.
- Takago, H. & Oshima-Takago, T. (2018) Pre- and postsynaptic ionotropic glutamate receptors in the auditory system of mammals. *Hear Res*, **362**, 1-13.
- Takahashi, T., Forsythe, I.D., Tsujimoto, T., Barnes-Davies, M. & Onodera, K. (1996) Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science*, **274**, 594-597.
- Takeuchi, T., Duzsikiewicz, A.J. & Morris, R.G. (2014) The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **369**, 20130288.
- Tamaru, Y., Nomura, S., Mizuno, N. & Shigemoto, R. (2001) Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience*, **106**, 481-503.

- Tang, A.H. & Alger, B.E. (2015) Homer protein-metabotropic glutamate receptor binding regulates endocannabinoid signaling and affects hyperexcitability in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci*, **35**, 3938-3945.
- Tang, B., Wang, T., Wan, H., Han, L., Qin, X., Zhang, Y., Wang, J., Yu, C., Berton, F., Francesconi, W., Yates, J.R., 3rd, Vanderklish, P.W. & Liao, L. (2015) Fmr1 deficiency promotes age-dependent alterations in the cortical synaptic proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, E4697-4706.
- Thanawala, M.S. & Regehr, W.G. (2013) Presynaptic calcium influx controls neurotransmitter release in part by regulating the effective size of the readily releasable pool. *J Neurosci*, **33**, 4625-4633.
- Thomas, M.J., Moody, T.D., Makhinson, M. & O'Dell, T.J. (1996) Activity-dependent beta-adrenergic modulation of low frequency stimulation induced LTP in the hippocampal CA1 region. *Neuron*, **17**, 475-482.
- Tibbs, G.R., Barrie, A.P., Van Mieghem, F.J., McMahon, H.T. & Nicholls, D.G. (1989) Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free Ca^{2+} and glutamate release. *J Neurochem*, **53**, 1693-1699.
- Till, S.M., Wijetunge, L.S., Seidel, V.G., Harlow, E., Wright, A.K., Bagni, C., Contractor, A., Gillingwater, T.H. & Kind, P.C. (2012) Altered maturation of the primary somatosensory cortex in a mouse model of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, **21**, 2143-2156.
- Toft, A.K., Lundbye, C.J. & Banke, T.G. (2016) Dysregulated NMDA-Receptor Signaling Inhibits Long-Term Depression in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *J Neurosci*, **36**, 9817-9827.
- Tomioka, N.H., Yasuda, H., Miyamoto, H., Hatayama, M., Morimura, N., Matsumoto, Y., Suzuki, T., Odagawa, M., Odaka, Y.S., Iwayama, Y., Won Um, J., Ko, J., Inoue, Y., Kaneko, S., Hirose, S., Yamada, K., Yoshikawa, T., Yamakawa, K. & Aruga, J. (2014) Elfn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. *Nat Commun*, **5**, 4501.
- Tu-Sekine, B. & Raben, D.M. (2011) Regulation and roles of neuronal diacylglycerol kinases: a lipid perspective. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **46**, 353-364.
- Turu, G. & Hunyady, L. (2010) Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol*, **44**, 75-85.

- Twitchell, W., Brown, S. & Mackie, K. (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, **78**, 43-50.
- Uchida, N., Honjo, Y., Johnson, K.R., Wheelock, M.J. & Takeichi, M. (1996) The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol*, **135**, 767-779.
- Ul Haq, R., Anderson, M., Liotta, A., Shafiq, M., Sherkheli, M.A. & Heinemann, U. (2016) Pretreatment with beta-adrenergic receptor agonists facilitates induction of LTP and sharp wave ripple complexes in rodent hippocampus. *Hippocampus*, **26**, 1486-1492.
- Uriu, Y., Kiyonaka, S., Miki, T., Yagi, M., Akiyama, S., Mori, E., Nakao, A., Beedle, A.M., Campbell, K.P., Wakamori, M. & Mori, Y. (2010) Rab3-interacting molecule gamma isoforms lacking the Rab3-binding domain induce long lasting currents but block neurotransmitter vesicle anchoring in voltage-dependent P/Q-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem*, **285**, 21750-21767.
- Uutela, M., Lindholm, J., Rantamaki, T., Umemori, J., Hunter, K., Voikar, V. & Castren, M.L. (2014) Distinctive behavioral and cellular responses to fluoxetine in the mouse model for Fragile X syndrome. *Front Cell Neurosci*, **8**, 150.
- Uzunova, G., Hollander, E. & Shepherd, J. (2014) The role of ionotropic glutamate receptors in childhood neurodevelopmental disorders: autism spectrum disorders and fragile x syndrome. *Curr Neuropharmacol*, **12**, 71-98.
- Vandenberg, R.J. & Ryan, R.M. (2013) Mechanisms of glutamate transport. *Physiol Rev*, **93**, 1621-1657.
- Vanvuchelen, M., Roeyers, H. & De Weerd, W. (2007) Nature of motor imitation problems in school-aged boys with autism: a motor or a cognitive problem? *Autism*, **11**, 225-240.
- Varoqueaux, F., Sigler, A., Rhee, J.S., Brose, N., Enk, C., Reim, K. & Rosenmund, C. (2002) Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9037-9042.
- Veeraragavan, S., Graham, D., Bui, N., Yuva-Paylor, L.A., Wess, J. & Paylor, R. (2012) Genetic reduction of muscarinic M4 receptor modulates analgesic response and acoustic startle response in a mouse model of fragile X syndrome (FXS). *Behav Brain Res*, **228**, 1-8.

- Ventura, R., Pascucci, T., Catania, M.V., Musumeci, S.A. & Puglisi-Allegra, S. (2004) Object recognition impairment in Fmr1 knockout mice is reversed by amphetamine: involvement of dopamine in the medial prefrontal cortex. *Behav Pharmacol*, **15**, 433-442.
- Vinals, X., Moreno, E., Lanfumey, L., Cordini, A., Pastor, A., de La Torre, R., Gasperini, P., Navarro, G., Howell, L.A., Pardo, L., Lluís, C., Canela, E.I., McCormick, P.J., Maldonado, R. & Robledo, P. (2015) Cognitive Impairment Induced by Delta9-tetrahydrocannabinol Occurs through Heteromers between Cannabinoid CB1 and Serotonin 5-HT2A Receptors. *PLoS Biol*, **13**, e1002194.
- Vinueza Veloz, M.F., Buijsen, R.A., Willemsen, R., Cupido, A., Bosman, L.W., Koekkoek, S.K., Potters, J.W., Oostra, B.A. & De Zeeuw, C.I. (2012) The effect of an mGluR5 inhibitor on procedural memory and avoidance discrimination impairments in Fmr1 KO mice. *Genes Brain Behav*, **11**, 325-331.
- Vizi, E.S. & Lendvai, B. (1999) Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*, **30**, 219-235.
- Vliem, M.J., Ponsioen, B., Schwede, F., Pannekoek, W.J., Riedl, J., Kooistra, M.R., Jalink, K., Genieser, H.G., Bos, J.L. & Rehmann, H. (2008) 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM: an improved Epac-selective cAMP analogue. *Chembiochem*, **9**, 2052-2054.
- Wager-Miller, J., Westenbroek, R. & Mackie, K. (2002) Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem Phys Lipids*, **121**, 83-89.
- Wang, H., Dichtenberg, J.B., Ku, L., Li, W., Bassell, G.J. & Feng, Y. (2008) Dynamic association of the fragile X mental retardation protein as a messenger ribonucleoprotein between microtubules and polyribosomes. *Mol Biol Cell*, **19**, 105-114.
- Wang, X., Chen, G., Gao, W. & Ebner, T. (2009) Long-term potentiation of the responses to parallel fiber stimulation in mouse cerebellar cortex in vivo. *Neuroscience*, **162**, 713-722.
- Wang, Y., Sugita, S. & Sudhof, T.C. (2000) The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. *J Biol Chem*, **275**, 20033-20044.
- Wang, Z.W. (2008) Regulation of synaptic transmission by presynaptic CaMKII and BK channels. *Mol Neurobiol*, **38**, 153-166.

- Waung, M.W., Pfeiffer, B.E., Nosyreva, E.D., Ronesi, J.A. & Huber, K.M. (2008) Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron*, **59**, 84-97.
- Wilson, B.M. & Cox, C.L. (2007) Absence of metabotropic glutamate receptor-mediated plasticity in the neocortex of fragile X mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 2454-2459.
- Willard, S.S. & Koochekpour, S. (2013) Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int J Biol Sci*, **9**, 948-959.
- Woodhall, G.L., Ayman, G. & Jones, R.S. (2007) Differential control of two forms of glutamate release by group III metabotropic glutamate receptors at rat entorhinal synapses. *Neuroscience*, **148**, 7-21.
- Wrenn, C.C., Heitzer, A.M., Roth, A.K., Nawrocki, L. & Valdovinos, M.G. (2015) Effects of clonidine and methylphenidate on motor activity in Fmr1 knockout mice. *Neurosci Lett*, **585**, 109-113.
- Xie, J.D., Chen, S.R. & Pan, H.L. (2017) Presynaptic mGluR5 receptor controls glutamatergic input through protein kinase C-NMDA receptors in paclitaxel-induced neuropathic pain. *J Biol Chem*, **292**, 20644-20654.
- Xue, M., Craig, T.K., Xu, J., Chao, H.T., Rizo, J. & Rosenmund, C. (2010) Binding of the complexin N terminus to the SNARE complex potentiates synaptic-vesicle fusogenicity. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 568-575.
- Yan, Q.J., Asafo-Adjei, P.K., Arnold, H.M., Brown, R.E. & Bauchwitz, R.P. (2004) A phenotypic and molecular characterization of the fmr1-tm1Cgr fragile X mouse. *Genes Brain Behav*, **3**, 337-359.
- Yang, Y. & Calakos, N. (2010) Acute in vivo genetic rescue demonstrates that phosphorylation of RIM1alpha serine 413 is not required for mossy fiber long-term potentiation. *J Neurosci*, **30**, 2542-2546.
- Yang, Y. & Pan, C. (2013) Role of metabotropic glutamate receptor 7 in autism spectrum disorders: a pilot study. *Life Sci*, **92**, 149-153.
- Yang, Y., Shu, X., Liu, D., Shang, Y., Wu, Y., Pei, L., Xu, X., Tian, Q., Zhang, J., Qian, K., Wang, Y.X., Petralia, R.S., Tu, W., Zhu, L.Q., Wang, J.Z. & Lu, Y. (2012) EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation. *Neuron*, **73**, 774-788.

- Yim, Y.Y., Zurawski, Z. & Hamm, H. (2018) GPCR regulation of secretion. *Pharmacol Ther*, **192**, 124-140.
- Yoshida, T., Fukaya, M., Uchigashima, M., Miura, E., Kamiya, H., Kano, M. & Watanabe, M. (2006) Localization of diacylglycerol lipase- α around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor. *J Neurosci*, **26**, 4740-4751.
- Yu, H., Rathore, S.S., Lopez, J.A., Davis, E.M., James, D.E., Martin, J.L. & Shen, J. (2013) Comparative studies of Munc18c and Munc18-1 reveal conserved and divergent mechanisms of Sec1/Munc18 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, E3271-3280.
- Yu, Y., Cao, D.Q., Xu, H.Y., Sun, M., Huang, Z.L., Yung, W.H., Lu, N. & Huang, Y. (2014) 5-HT_{3A} receptors are required in long-term depression and AMPA receptor internalization. *Neuroscience*, **278**, 105-112.
- Zalfa, F., Adinolfi, S., Napoli, I., Kuhn-Holsken, E., Urlaub, H., Achsel, T., Pastore, A. & Bagni, C. (2005) Fragile X mental retardation protein (FMRP) binds specifically to the brain cytoplasmic RNAs BC1/BC200 via a novel RNA-binding motif. *J Biol Chem*, **280**, 33403-33410.
- Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., Oostra, B. & Bagni, C. (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell*, **112**, 317-327.
- Zamponi, G.W. & Snutch, T.P. (1998) Decay of prepulse facilitation of N type calcium channels during G protein inhibition is consistent with binding of a single G β subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4035-4039.
- Zhang, C., Yu, Y., Ruan, L., Wang, C., Pan, J., Klabnik, J., Lueptow, L., Zhang, H.T., O'Donnell, J.M. & Xu, Y. (2015a) The roles of phosphodiesterase 2 in the central nervous and peripheral systems. *Curr Pharm Des*, **21**, 274-290.
- Zhang, C.S., Bertaso, F., Eulenburg, V., Lerner-Natoli, M., Herin, G.A., Bauer, L., Bockaert, J., Fagni, L., Betz, H. & Scheschonka, A. (2008) Knock-in mice lacking the PDZ-ligand motif of mGluR7a show impaired PKC-dependent autoinhibition of glutamate release, spatial working memory deficits, and increased susceptibility to pentylenetetrazol. *J Neurosci*, **28**, 8604-8614.
- Zhang, H.T. (2015) Targeting phosphodiesterases (PDEs) for treatment of CNS diseases. *Curr Pharm Des*, **21**, 271-273.

- Zhang, L. & Alger, B.E. (2010) Enhanced endocannabinoid signaling elevates neuronal excitability in fragile X syndrome. *J Neurosci*, **30**, 5724-5729.
- Zhang, P., Abdelmohsen, K., Liu, Y., Tominaga-Yamanaka, K., Yoon, J.H., Ioannis, G., Martindale, J.L., Zhang, Y., Becker, K.G., Yang, I.H., Gorospe, M. & Mattson, M.P. (2015b) Novel RNA- and FMRP-binding protein TRF2-S regulates axonal mRNA transport and presynaptic plasticity. *Nat Commun*, **6**, 8888.
- Zhao, K., Wen, R., Wang, X., Pei, L., Yang, Y., Shang, Y., Bazan, N., Zhu, L.Q., Tian, Q. & Lu, Y. (2013) EPAC inhibition of SUR1 receptor increases glutamate release and seizure vulnerability. *J Neurosci*, **33**, 8861-8865.
- Zhou, H.C., Sun, Y.Y., Cai, W., He, X.T., Yi, F., Li, B.M. & Zhang, X.H. (2013a) Activation of beta2-adrenoceptor enhances synaptic potentiation and behavioral memory via cAMP-PKA signaling in the medial prefrontal cortex of rats. *Learn Mem*, **20**, 274-284.
- Zhou, P., Pang, Z.P., Yang, X., Zhang, Y., Rosenmund, C., Bacaj, T. & Sudhof, T.C. (2013b) Syntaxin-1 N-peptide and Habc-domain perform distinct essential functions in synaptic vesicle fusion. *EMBO J*, **32**, 159-171.
- Zingerevich, C., Greiss-Hess, L., Lemons-Chitwood, K., Harris, S.W., Hessel, D., Cook, K. & Hagerman, R.J. (2009) Motor abilities of children diagnosed with fragile X syndrome with and without autism. *J Intellect Disabil Res*, **53**, 11-18.